



TUGAS AKHIR - SB141510

## RESISTENSI DAN POTENSI *Bacillus* SEBAGAI BIOREMOVAL LOGAM KADMIUM (Cd)

TRIO VERDIAN  
151110073

Dosen Pembimbing:  
Dr. Enny Zulaika, MP.

JURUSAN BIOLOGI  
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2015



Final Project - SB141510

## RESISTANCE AND POTENCY *Bacillus* AS BIOREMOVAL CADMIUM (Cd)

TRIO VERDIAN  
151110073

Advisor Lecturer:  
Dr. Enny Zulaika, MP.

BIOLOGY DEPARTMENT  
Mathematics and Natural Science Faculty  
Institute of Technology Sepuluh Nopember  
Surabaya 2015

## LEMBAR PENGESAHAN

### RESISTENSI DAN POTENSI *Bacillus* SEBAGAI BIOREMOVAL LOGAM KADMIUM (Cd)

#### TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh  
Gelar Sarjana Sains  
Pada  
Jurusan S-1 Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

**TRIO VERDIAN**  
**NRP. 1511 100 073**


Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Dr. Enny Zulaika, MP  (Pembimbing 1)

Surabaya, 8 Juli 2015

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



  
Dr. rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si  
NIP. 19690907 199803 2 001

## RESISTENSI DAN POTENSI *Bacillus* SEBAGAI BIOREMOVAL LOGAM KADMIUM (Cd)

**Nama Mahasiswa : Trio Verdian**  
**NRP : 1511 100 073**  
**Jurusan : Biologi**  
**Dosen Pembimbing : Dr. Enny Zulaika, MP.**

### Abstrak

*Keberadaan logam cadmium di lingkungan memiliki efek toksik yang sangat tinggi. Cadmium tidak memiliki fungsi biologis untuk organisme dan dapat mengganggu metabolisme secara seluler. Beberapa bakteri resisten terhadap logam berat termasuk cadmium di antara dari genus Bacillus. Apakah Bacillus yang resisten cadmium mampu melakukan aktivitas bioremoval terhadap cadmium.*

*Masing-masing uji resistensi dan uji viabilitas dilakukan pada media nutrisi agar dan nutrisi broth yang mengandung CdCl<sub>2</sub>. Uji bioremoval dilakukan dengan pemaparan CdCl<sub>2</sub> ke dalam medium kultur Bacillus dan konsentrasi Cd diukur dengan AAS. Analisis data diuji dengan ANOVA dan uji beda nyata terkecil.*

*Semua isolat Bacillus resisten pada media yang mengandung CdCl<sub>2</sub> sampai dengan 30 mg/L. Isolat Bacillus DA11 dapat mengurangi konsentrasi Cd<sup>2+</sup> di medium kultur paling besar dibanding isolat Bacillus S1 dan SS19 yaitu 3,73 mg/L dari konsentrasi 23,75 mg/L yang dipaparkan. Dengan efisiensi bioremoval maksimal 35,81% dari pemaparan 6,527 mg/L.*

**Kata Kunci : Bacillus, Bioremoval, Kadmium, Logam Berat**



## RESISTANCE AND POTENCY OF *Bacillus* AS BIOREMOVAL CADMIUM (Cd)

**Student Name** : Trio Verdian  
**NRP** : 1511 100 073  
**Department** : Biology  
**Supervisor** : Dr. Enny Zulaika, MP.

### Abstract

Cadmium availability at environment causes jeopardize effect for organism. Cadmium has no biological function and disrupt cell metabolism. *Bacillus* is one of the bacteria genera which resist to cadmium toxicity. Resistance ability and Isolate viability tested using nutrient agar and nutrient broth medium with various concentration of CdCl<sub>2</sub>. Bioremoval efficiency assay by AAS and data analyzing with ANOVA. The result shows that all of the isolate resisted to 30 mg/L CdCl<sub>2</sub>. *Bacillus* DA11 has the highest bioremoval ability than S1 and SS19 at concentration 23,75 mg/L which was 3,73 mg/L. It also has the highest bioremoval efficiency at concentration 6,527 mg/L which was 35,81%.

**Keywords:** *Bacillus*, bioremoval, cadmium, heavy metal

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, rasa syukur dipanjatkan kepada kehadiran Allah SWT yang telah memberikan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan Tugas Akhir dengan judul **Resistensi dan Potensi *Bacillus* Sebagai Bioremoval Logam Kadmium (Cd)**. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Mei 2015. Penyusunan Tugas Akhir ini merupakan syarat untuk memperoleh gelar sarjana strata 1 (S1) pada jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Dalam melakukan penelitian maupun penyusunan Tugas Akhir tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada, Dr. Enny Zulaika, MP selaku pembimbing serta tim penguji, Dr. Nurul Jadid, M.Sc. dan N. Dwianita Kuswytasari, S.Si.,M.Si. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak, Ibu dan kakak-kakak (Santi & Eko) atas doa serta dukungannya. Penulisan Tugas Akhir ini juga tidak lepas dari bantuan dan dukungan anggota *research group Bioremediation and Biofertilizer* (Naya, Adis, Septa, Nadia, Faisal, Aidit, Tata, Fahima, Lilis dan Amel), Nivi serta Cholis dan teman-teman seperjuangan angkatan 2011 (*Scylla Serrata*), serta seluruh pihak yang telah membantu.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan, namun besar harapan penulis semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat.

Surabaya, 8 Juli 2015

Trio Verdian



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
ABSTRAK .....	iii
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Permasalahan .....	2
1.3 Batasan Masalah .....	2
1.4 Tujuan .....	3
1.5 Manfaat .....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kadmium (Cd). .....	5
2.2 Toksisitas Kadmium.....	6
2.3 Bakteri Resistensi Kadmium.....	7
2.4 <i>Bacillus</i> . .....	9
2.5 <i>Bioremoval</i> .....	10
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	11
3.2 Metode Penelitian.....	11
3.2.1 Persiapan subkultur dan Uji Rekonfirmasi Genus <i>Bacillus</i> .....	11
3.2.2 Uji Resistensi isolat <i>Bacillus</i> dan terhadap Range <i>Finding Test</i> CdCl <sub>2</sub> .....	13

3.2.3 Uji Viabilitas Isolat terhadap Cekaman CdCl <sub>2</sub> .....	13
3.2.4 Penentuan Umur Perlakuan (μ jam) pada Isolat <i>Bacillus</i> sebagai Starter Uji <i>Bioremoval</i> .....	14
3.2.5 Uji Bioremoval Logam Berat CdCl <sub>2</sub> .....	15
3.2.6 Viabilitas <i>Bacillus</i> .....	16
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data.....	16
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Rekonfirmasi Genus <i>Bacillus</i> ... ..	19
4.2 Resistensi dan <i>Range Finding Test Bacillus</i> terhadap Logam Cd.....	20
4.3 Viabilitas <i>Bacillus</i> S1, SS19 dan DA11 Terpapar Logam Cd.....	21
4.4 Starter Isolat <i>Bacillus</i> (μ maksimum).....	24
4.5 Uji <i>Bioremoval</i> .....	25
4.6 Uji Viabilitas <i>Bacillus</i> .....	29
KESIMPULAN.....	31
DAFTAR PUSTAKA .....	33
LAMPIRAN.....	39



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil Uji Rekonfirmasi <i>Bacillus</i> .....	19
Tabel 4.2 Resistensi <i>Bacillus</i> Terhadap $\text{CdCl}_2$ .....	20
Tabel 4.3 Konsentrasi logam Cd tanpa inokulum.....	25
Tabel 4.4 <i>Bioremoval</i> Logam Cd oleh <i>Bacillus</i> .....	27
Tabel 4.5 Uji ulang <i>Bioremoval</i> S1.....	28
Tabel 4.6 Hasil Uji Viabilitas Isolat <i>Bacillus</i> .....	30

## DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1.	Komposisi Medium NA.....	40
Lampiran 2.	Komposisi Medium NB.....	40
Lampiran 3.	Skema Kerja.....	41
Lampiran 4.	Skema Kerja Uji Rekonfirmasi.....	42
Lampiran 5.	Foto hasil uji rekonfirmasi.....	45
Lampiran 6.	Hasil subkultur isolat <i>Bacillus</i> .....	49
Lampiran 7.	Perhitungan umur perlakuan <i>bioremoval</i> ( $\mu$ jam) dan perhitungan jumlah sel/ml.....	50
Lampiran 8.	Foto Hasil Uji Resistensi <i>Bacillus</i> Terhadap CdCl <sub>2</sub> .....	51
Lampiran 9.	Foto Hasil Uji Viabilitas <i>Bacillus</i> setelah terpapar CdCl <sub>2</sub> .....	52



## **BAB I PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Logam berat merupakan unsur alami yang bersifat persisten di lingkungan karena tidak dapat di degradasi, mempunyai efek toksik dan dapat terakumulasi melalui rantai makanan (Ozdemir *et al.*, 2009). Beberapa logam berat seperti tembaga (Cu) dan seng (Zn) merupakan mikronutrien esensial yang dibutuhkan saat proses metabolisme pada makhluk hidup (Rathnayake *et al.*, 2009), namun beberapa logam berat secara biologis dapat berbahaya jika terakumulasi bahkan pada konsentrasi yang sangat rendah, logam tersebut di antaranya merkuri (Hg), kadmium (Cd) dan timbal (Pb) (Almeida *et al.*, 2009). Cd dan Hg memiliki sifat toksisitas tinggi yang dapat mengganggu proses metabolisme suatu organisme (Suhendrayatna, 2001).

Keberadaan logam Cd di lingkungan dapat berasal dari kegiatan antropogenik, salah satunya berasal dari industri elektroplating (Chien *et al.*, 2003). Kadmium memiliki efek toksik yang sangat tinggi dan memiliki waktu paruh yang panjang di dalam tubuh organisme (Patrick, 2003). Efek toksik dari kadmium disebabkan antara kadmium dan gugus fungsional protein dapat membentuk ikatan ligan sehingga protein tersebut kehilangan fungsinya (Alfian, 2005). Kadmium tidak memiliki fungsi biologis di dalam sel tetapi memiliki sifat reaktif yang sangat tinggi dan dapat menginaktifkan berbagai macam aktivitas enzim yang diperlukan (Jonak *et al.*, 2004). Bagi manusia kadmium dapat bersifat karsinogenik, merusak kelenjar endokrin, merusak sistem kardiovaskular dan dapat menyebabkan kerusakan sistem saraf (Boboccea *et al.*, 2008).

Upaya yang dilakukan dalam menanggulangi pencemaran logam berat dengan melakukan remediasi, salah satunya menggunakan mikroorganisme yang dikenal dengan metode bioremediasi. Bakteri merupakan mikroorganisme yang mempunyai sebaran luas di alam dan hidup di berbagai habitat



serta mampu menguraikan senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana untuk memperoleh zat tertentu yang dibutuhkan (Hatmanti, 2000). Bakteri dapat bersifat patogen bagi makhluk hidup yang lain, namun bakteri juga memiliki manfaat diantaranya sebagai agen produksi enzim, antibiotik, industri makanan dan juga sebagai *bioremoval* senyawa xenobiotik. Beberapa bakteri mempunyai resistensi terhadap logam berat dengan mekanisme eksklusi barrier permeabilitas, ikatan ligan, transport aktif, pompa efflux dan detoksifikasi enzimatis (Colak *et al.*, 2011).

*Bacillus* merupakan bakteri yang melimpah di alam, dapat diisolasi dari udara, tanah, air tawar atau asin, baik di lingkungan normal ataupun ekstrim seperti tercemar logam berat (Kim *et al.*, 2011). Anggota genus *Bacillus* yang diisolasi dari Kalimas Surabaya resisten terhadap logam Cd sampai dengan 45 ppm (Arinda *et al.*, 2012). Kemampuan resistensi *Bacillus* terhadap logam Cd tersebut menunjukkan toksisitas Cd tidak berpengaruh terhadap metabolismenya, diasumsikan *Bacillus* tersebut mampu melakukan *bioremoval* terhadap logam Cd.

### 1.1 Rumusan Permasalahan

Anggota genus *Bacillus* yang diisolasi dari Kalimas Surabaya resisten terhadap logam Cd, apakah anggota genus *Bacillus* tersebut mampu melakukan *bioremoval* terhadap logam Cd?

### 1.2 Batasan Masalah

Batasan masalah yang digunakan dalam penelitian adalah;

1. Isolat yang digunakan adalah *Bacillus* A<sub>6</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>1</sub>, SS<sub>19</sub>, DA<sub>11</sub> dan ATCC 1178 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA-ITS.
2. Logam Cd yang digunakan adalah CdCl<sub>2</sub>.
3. Pengukuran konsentrasi CdCl<sub>2</sub> dengan metode spektrofotometri menggunakan Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) dengan panjang gelombang  $\lambda = 228,8 \text{ nm}$ .

### 1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk;

1. Mendapatkan anggota genus *Bacillus* yang resisten Cd
2. Mengetahui kemampuan isolat melakukan *bioremoval* terhadap logam Cd.

### 1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan bahwa isolat *Bacillus* diatas dapat dimanfaatkan sebagai agen *bioremoval* logam Cd dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen bioremediasi lahan tercemar Cd yang ramah lingkungan.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kadmium (Cd)

Kadmium merupakan suatu unsur kimia dalam tabel periodik yang memiliki lambang Cd dan nomor atom 48, berat atom 112,4, titik leleh 321°C, titik didih 767°C dan memiliki masa jenis 8,65 g/cm<sup>3</sup> (Widowati *et al*, 2008).

Kadmium merupakan unsur kimia yang masuk ke dalam golongan logam berat, Duruibe *et al.* (2007) menjelaskan bahwa istilah logam berat merujuk pada elemen logam yang memiliki kepadatan tinggi yakni lebih dari 5g/cm<sup>3</sup> dan bersifat toksik atau racun bahkan jika terpapar pada konsentrasi yang rendah.

Kadmium mempunyai sifat fisik berwarna putih perak, lunak serta tahan korosi. Kadmium (Cd) umumnya terdapat dalam kombinasi dengan klor (CdCl) atau belerang (CdS). Secara kimia sifat logam kadmium dalam persenyawaan yang dibentuk umumnya mempunyai bilangan valensi 2<sup>+</sup>, kadmium yang membentuk ion Cd<sup>2+</sup> bersifat tidak stabil. Karakteristik kadmium yang lainnya adalah bila dimasukkan ke dalam larutan yang mengandung ion OH<sup>-</sup>, ion Cd<sup>2+</sup> akan mengalami pengendapan. Endapan yang terbentuk biasanya dalam bentuk senyawa terhidratasi yang berwarna putih. (Palar, 2008).

Logam kadmium banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari manusia diantaranya sebagai bahan stabilisator, bahan pewarna industri plastik, pelapisan timah dan elektroplating (Palar, 2008). Secara alami logam kadmium dalam konsentrasi yang rendah terdapat di dalam tanah dan air. Di dalam tanah kadmium dapat ditemukan dalam suspensi partikel sedangkan kadmium dalam air ditemukan dalam bentuk ikatan CdCl<sub>2</sub>, CdSO<sub>4</sub>, Cd(OH)<sub>2</sub> dan CdCO<sub>3</sub> (Friberg dalam Naryaningsih, 2005). Baku mutu kandungan Cd pada limbah kawasan industri sesuai dengan Peraturan Menteri Negara Lingkungan Hidup No. 3 tahun 2010 adalah sebesar 0,1 mg/L.

## 2.2 Toksisitas Kadmium

Beberapa logam berat merupakan komponen yang dibutuhkan oleh sel dalam jumlah sedikit, misalnya nikel, kobalt, mangan dan seng. Sementara logam lain seperti arsen (As), kromium (Cr), tembaga (Cu), merkuri (Hg) dan kadmium (Cd) merupakan logam yang tidak dibutuhkan oleh sel terutama bakteri sehingga mempunyai sifat yang sangat toksik (Misra, 1992). Kadmium merupakan logam berat yang memiliki efek toksisitas tinggi bagi organisme, bahkan pada tingkat konsentrasi yang rendah (Almeida *et al.*, 2009). Jonak *et al.* (2004) menjelaskan bahwa kadmium tidak diketahui memiliki fungsi biologis di dalam sel tetapi memiliki sifat reaktif yang sangat tinggi dan dapat menginaktivkan berbagai macam aktivitas enzim yang diperlukan oleh sel.

Logam berat dalam sel dapat berikatan dengan gugus sulfhidril (-SH) dari asam-asam amino sehingga menyebabkan inhibisi kinerja enzim. Selain itu, kerja ion-ion fisiologis dapat terganggu oleh adanya logam berat, seperti logam Cd yang mengganggu kerja ion Zn atau Ca. Senyawa oksianion logam berat apabila tereduksi dalam sel dapat menghasilkan radikal bebas yang akan berikatan dengan Deoxyribonucleic Acid (DNA) sehingga dapat mengakibatkan mutasi (Nies, 1999).

Secara biomolekuler, kadmium diabsorpsi oleh organisme dan terakumulasi di dalam sitosol melalui pembentukan kompleks metal-ligan (Dailanis & Kaloyianni, 2004). Bagi manusia logam kadmium merupakan salah satu jenis logam berat yang berbahaya karena elemen ini beresiko tinggi terhadap pembuluh darah, dalam jangka waktu panjang logam kadmium yang terakumulasi dapat menyebabkan kerusakan pada hati dan ginjal (Suhendrayatna, 2001).



### 2.3 Bakteri Resistensi Kadmium

Permukaan bakteri Gram positif dan Gram negatif merupakan permukaan yang baik untuk penyerapan kation logam lingkungan air. Hal ini karena sifat anionik dari *peptidoglikan* dan polimer kedua yang menyusun permukaan bakteri Gram positif dan karena grup fosforil dari *lipopolisakarida* yang terdapat pada membran luar bakteri Gram negatif. Secara umum permukaan dinding sel bakteri Gram positif mempunyai kapasitas yang lebih besar untuk mengikat ion logam daripada bakteri Gram negatif (Allen, 1995; Naryaningsih, 2005).

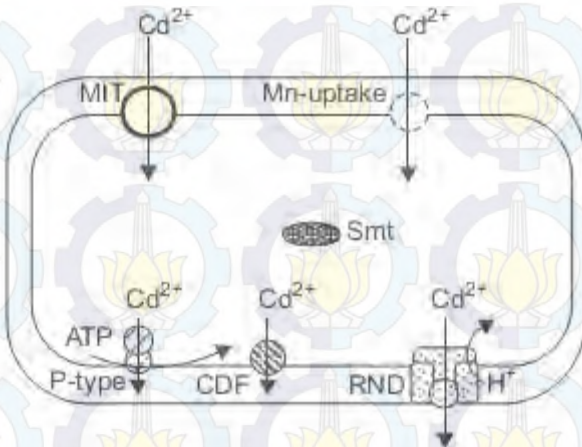
Nies (1999) menjelaskan bahwa resistensi terhadap logam berat disebabkan adanya kemampuan bakteri dalam menurunkan ataupun menghilangkan toksisitas logam berat tersebut. Cara yang dilakukan adalah dengan :

1. Mengakumulasi logam berat kemudian mengurangi kadar toksisitas logam berat yang berlebih dengan mekanisme transport aktif pompa *efflux*.
2. Logam berat bermuatan positif (kation) membentuk senyawa kompleks dengan tiol yang mengandung gugus (-SH).
3. Ion logam mengalami proses reduksi

Mekanisme resistensi bakteri terhadap logam berat dapat dilakukan dengan mengkombinasikan dua ataupun tiga proses sekaligus. Pada saat bakteri menggunakan mekanisme reduksi dalam detoksifikasi logam berat maka akan dibantu transport aktif pompa *efflux* untuk mengeluarkan hasil dari proses reduksi tersebut (Nies, 1999).

Dengan mengikat kelompok gugus (-SH), ion logam berat dapat menghambat aktivitas dan fungsi enzim. Kation juga dapat dipisahkan menjadi senyawa kompleks dengan tiol, sehingga toksisitas beberapa ion logam berat dapat dikurangi atau bahkan hilang (Nies, 1999).





Gambar 2.1. Mekanisme bakteri resisten Cd (Nies, 1999).

Pada bakteri Gram positif resisten Cd<sup>2+</sup> memiliki jalur masuk logam Cd<sup>2+</sup> Mn transport sedangkan pada Gram negatif menggunakan *metal ion transport* (MIT)/Mg transport (Nies, 2003). Untuk proses pengeluaran logam Cd<sup>2+</sup> dapat dilakukan melalui transport aktif pompa efflux (P-type) pada Gram positif serta pada Gram negatif oleh sistem transport CDF dan RND (Nies, 1999). Pompa efflux (P-type) dikatalisis oleh protein CadCA yang dihasilkan oleh sistem CadCA operon (Sochor, 2011). Smt metallothionein pada kromosom bakteri mengalami proses transkripsi dan mensintesis metallothionein yang mengikat Cd<sup>2+</sup> membentuk senyawa kompleks yang stabil (Sochor *et al*, 2011).

#### 2.4 *Bacillus*

*Bacillus* merupakan organisme bersel tunggal, berbentuk batang pendek (rod) biasanya dalam bentuk rantai panjang, bersifat obligat aerob atau fakultatif anaerob, Gram positif, suhu pertumbuhan maksimum 37 – 48°C dan minimum pada suhu 5 -

20 °C serta pH pertumbuhannya 5,5 – 8,5. Memiliki ukuran 0,3 – 2,2  $\mu$  x 127 – 7,0  $\mu$ m. Sebagian besar motil, flagelum khas lateral. Membentuk endospora, tidak lebih dari satu dalam satu sel sporangium. Kemoorganotrof serta hasil uji katalase positif. Metabolisme dengan respirasi sejati, fermentasi sejati, atau kedua-duanya, yaitu respirasi dan fermentasi. anaerobik fakultatif. Umum dijumpai di dalam tanah (Pelczar dan Chan, 2005).

*Bacillus* memiliki endospora sebagai mekanisme resistensi terhadap panas. Menurut Fardiaz (1992) *Bacillus* memiliki bentuk endospora yang bervariasi bergantung pada spesiesnya. Endospora ada yang lebih kecil dan ada juga yang lebih besar dari diameter sel induknya. Waluyo (2007) menjelaskan, ada dua tipe spora yang terbentuk, pertama terbentuk di dalam sel disebut dengan endospora dan di luar sel disebut dengan eksospora. Resistensi endospora terhadap panas disebabkan oleh kadar air yang dikandungnya dan pembungkus spora yang tebal (Koes, 2006).

*Bacillus* mampu tumbuh baik di lingkungan normal ataupun ekstrim seperti lingkungan yang tercemar logam berat (Kim *et al.*, 2011). *Bacillus* merupakan salah satu genera bakteri yang memiliki kemampuan resistensi terhadap logam Hg, Cd, Pb dan Cu (Arinda *et al.*, 2012).

## 2.5 Bioremoval

*Bioremoval* adalah suatu proses pengurangan kontaminan logam berat pada lingkungan yang memanfaatkan aktivitas biologis suatu organisme maupun mikroorganisme. *Bioremoval* merupakan pembentukan kompleks stabil antara logam berat yang bersifat kation dengan biopolimer seluler yang bermuatan negatif pada bakteri (Daboor, 2014).

Dinding sel bakteri yang terdiri dari peptidoglikan memiliki sifat anionik sehingga mampu mengikat logam berat yang bersifat kation dan terjadi interaksi elektrostatik (Daboor, 2014).



*Bioremoval* terjadi dengan dua cara yaitu *passive uptake* serta *active uptake*. Proses penyerapan secara pasif (*passive uptake*) disebut juga biosorpsi sedangkan penyerapan aktif disebut bioakumulasi. Biosorpsi merupakan pengikatan ion logam berat pada dinding sel melalui dua cara. Pertama, pertukaran ion monovalen dan divalen pada dinding sel seperti Na, Mg dan Ca akan digantikan oleh ion logam berat. Kedua, terbentuknya senyawa kompleks antara ion logam berat dengan gugus fungsional protein pada dinding (Suhendrayatna, 2001). Penyerapan aktif (bioakumulasi) merupakan mekanisme yang terjadi secara simultan pada sel hidup dengan konsumsi ion logam untuk pertumbuhan mikroorganisme. Logam berat dapat diendapkan pada proses metabolisme dan diekskresikan ke lingkungan (Suhendrayatna, 2001).



## BAB III METODOLOGI

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2014 sampai Mei 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA-ITS, Surabaya.

### 3.2. Metode Penelitian

#### 3.2.1. Persiapan subkultur dan Uji Rekonfirmasi Genus *Bacillus*

Isolat *Bacillus* yang digunakan adalah isolat A6, S1, S6, SS19 dan DA11 dan ATCC 1178 yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA-ITS hasil isolasi dari Kalimas Surabaya (Zulaika *et al*, 2012). Subkultur isolat dilakukan menggunakan medium *Nutrient Agar* (NA) (Lampiran 1) yang telah disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Sebanyak satu ose isolat diinokulasikan secara aseptis dengan metode *streak continuous* pada media *agar slant*. Di inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Keberhasilan subkultur ditandai dengan adanya koloni yang tumbuh pada media *agar slant*.

Uji rekonfirmasi masing-masing isolat A6, S1, S6, SS19 dan DA11 menggunakan metode *generic assignment* dengan *profil matching* karakter kunci sesuai panduan *Bergey's Manual Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). Uji rekonfirmasi meliputi.

#### pengamatan bentuk sel

Isolat *Bacillus* berumur 24 jam difiksasi diatas kaca preparat. Ditetesi dengan *metylen blue* lalu di diamkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan aquades dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

### Pewarnaan Gram

Isolat *Bacillus* difiksasi diatas kaca preparat. Ditetesi *crystal violet* dan di diamkan selama 30 detik serta dibilas menggunakan aquades. Ditetesi iodin dan di diamkan selama 60 detik serta dibilas menggunakan aquades. Ditetesi alkohol 95% selama 15 detik serta dibilas menggunakan aquades. Ditetesi safranin dan di diamkan selama 60 detik serta dibilas menggunakan aquades. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

### Motilitas

Isolat *Bacillus* berumur 24 jam. Diambil biakan cair dan diletakkan pada dek glass yang telah diberi vaselin. Ditutup dengan objek glass berlekuk kemudian dibalik dengan cepat. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

### Pengamatan endospore

Isolat *Bacillus* berumur 24 jam difiksasi diatas kaca preparat dan ditutup kertas saring. Ditetesi pewarna *malachite green* di atas gelas beker berisi air mendidih dan di diamkan selama 5 menit. Kertas saring diambil dan dibilas aquades. Ditetesi safranin selama 60 detik dan dibilas aquades. Diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

### Pengamatan penggunaan oksigen (aerob/anaerob)

Isolat *Bacillus* berumur 24 jam. Diinokulasikan ke dalam medium thioglikolat. Diinkubasi selama 24 jam dan diamati.

### Pengamatan kemoorganotrof

Isolat *Bacillus* berumur 24 jam. Diinokulasikan ke dalam medium fermentasi (glukosa, sukrosa, lactosa dan manitol). Diinkubasi selama 24 jam dan diamati.



Uji katalase menggunakan  $H_2O_2$  3%.

Ditetaskan  $H_2O_2$  3% diatas kaca preparat dan diinokulasikan isolat. Diamati gelembung yang terbentuk.

### **3.2.2. Uji Resistensi Isolat *Bacillus* dan Range Finding Test $CdCl_2$**

Uji resistensi digunakan untuk mengetahui daya tahan isolat terhadap cekaman  $CdCl_2$ . Subkultur berumur 24 jam diinokulasikan secara aseptis dengan metode *streak continuous* pada media NA dengan kandungan  $CdCl_2$  0,1 mg/L. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang, koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap  $CdCl_2$ . Uji resistensi dilanjutkan sampai konsentrasi maksimal yang dapat ditolerir isolat.

*Range finding test* merupakan metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi logam  $CdCl_2$  yang dapat ditoleransi oleh isolat uji. Konsentrasi yang digunakan 10,20,30 mg/L dst. Isolat yang akan digunakan untuk uji *bioremoval* dipilih 3 isolat ( $B_1, B_2, B_3$ ) yang mempunyai toleransi  $CdCl_2$  lebih tinggi dibanding isolat lainnya. Konsentrasi yang digunakan dalam uji *bioremoval* adalah 3 konsentrasi ( $X_1, X_2, X_3$ ) mg/L yang berada dibawah konsentrasi maksimal serta mampu ditoleransi oleh isolat uji.

### **3.2.3. Uji Viabilitas Isolat terhadap Cekaman $CdCl_2$**

Uji viabilitas digunakan untuk mengetahui daya hidup isolat terhadap cekaman logam Cd. Daya hidup isolat direpresentasikan dengan kurva pertumbuhan.

Sebanyak satu ose isolat diinokulasikan secara aseptis ke dalam 20 ml medium NB (*Nutrient Broth*) (Lampiran 1). Inkubasi dilakukan di atas *rotary shaker* selama 24 jam pada suhu ruang. Selanjutnya kultur isolat sebanyak 20 ml ( $\pm 24$  jam) ditambahkan ke dalam 180 ml medium NB  $CdCl_2$  dengan konsentrasi sesuai



*range finding test* ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) mg/L. Inkubasi dilakukan di atas *rotary shaker* pada suhu ruang. Pada saat jam ke-0 dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) menggunakan *Spectrophotometer Spectronic GENEYSS 20®* ( $\lambda = 600$  nm). Pengukuran OD dilakukan selama 24 jam dengan interval waktu 1 jam. Hal serupa juga dilakukan pada kultur isolat tanpa mengandung  $\text{CdCl}_2$  sebagai kontrol.

### 3.2.4. Penentuan Umur Perlakuan ( $\mu$ maksimum) pada Isolat *Bacillus* sebagai Starter Uji *Bioremoval*

Umur perlakuan isolat untuk uji *bioremoval* ditentukan berdasarkan kurva pertumbuhan pada media NB tanpa  $\text{CdCl}_2$ .

Sebanyak satu ose isolat diinokulasikan secara aseptis ke dalam 20 ml medium NB (*Nutrient Broth*) (Lampiran 1). Inkubasi dilakukan di atas *rotary shaker* selama 24 jam pada suhu ruang. Selanjutnya kultur isolat sebanyak 20 ml ( $\pm 24$  jam) ditambahkan ke dalam 180 ml medium NB tanpa  $\text{CdCl}_2$ . Inkubasi dilakukan di atas *rotary shaker* pada suhu ruang. Pada saat jam ke-0 dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) menggunakan *Spectrophotometer Spectronic GENEYSS 20®* ( $\lambda = 600$  nm). Pengukuran OD dilakukan selama 24 jam dengan interval waktu 1 jam.

Umur perlakuan ( $\mu$  maksimum) dapat dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$(\mu) = a + \frac{(b - a)}{2}$$

Keterangan:  $\mu$  = umur kultur perlakuan

a = waktu fase log awal

b = waktu fase log akhir

### 3.2.5. Uji Bioremoval Logam Berat CdCl<sub>2</sub>

#### Pembuatan Larutan *Stock* CdCl<sub>2</sub> 100 mg/L

Sebanyak 10 mg CdCl<sub>2</sub> dilarutkan dalam 100 ml aquades steril secara aseptis sebagai larutan *stock* CdCl<sub>2</sub> dengan konsentrasi 100 mg/L.

#### Pembuatan *Starter Bacillus*

Medium *Nutrient Broth* (NB) disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Sebanyak satu ose isolat diinokulasikan secara aseptis ke dalam medium *Nutrien Broth* (NB) 20 ml. Inkubasi dilakukan di atas *rotary shaker* selama 18 jam pada suhu ruang. Setelah 24 jam kultur isolat 20 ml tersebut ditambahkan ke dalam 180 ml medium NB. Dilakukan inkubasi di atas *rotary shaker* pada suhu ruang sampai 6 jam sebagai starter. Sebelum pemaparan logam CdCl<sub>2</sub>, kepadatan sel dihitung menggunakan *Haemocytometer* dengan rumus berikut:

$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{N \times \text{Pengenceran}}{1/400 \text{ mm}^2 \times 80 \times 0,1 \text{ mm}} \times \frac{1000 \text{ mm}^2}{1 \text{ ml}}$
---

Keterangan:

N= Jumlah sel yang dihitung pada *Haemocytometer*

Pengenceran= Faktor pengenceran yang dipakai

1/400 mm<sup>2</sup>= Luas kotak kecil

80= Jumlah kotak kecil

1/10= Tinggi *Haemocytometer*

1000 mm<sup>2</sup>/1= Bentuk konversi ke satuan ml

#### Uji Bioremoval

Kultur starter ditambahkan CdCl<sub>2</sub> dengan konsentrasi sesuai range finding test (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>) mg/L sampai dengan volume 25 ml. Inkubasi dilakukan di atas *rotary shaker* (100 rpm) selama 24 jam. Selanjutnya kultur disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan sel dengan



filtratnya. Filtrat diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 5 tetes  $\text{HNO}_3$ , dipanaskan selama 10 menit. Analisis logam  $\text{CdCl}_2$  dilakukan dengan menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) ( $\lambda = 228,8 \text{ nm}$ ) (Yilmaz *et al*, 2005) di Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi Baristand Industri Surabaya.

Pengukuran *bioremoval* dilakukan dua kali ulangan. Konsentrasi logam Cd yang mampu di-*removal* oleh *Bacillus* dan efisiensi *removal*-nya dapat diketahui menggunakan perhitungan:

$$R = K_0 - K_s$$

$$E = (R/K_0) \times 100\%$$

Keterangan :

R = Konsentrasi Cd yang di *removal* oleh *Bacillus*

$K_0$  = Konsentrasi awal Cd dalam medium tanpa inokulum *Bacillus*

$K_s$  = Konsentrasi akhir Cd pada medium yang telah dipisahkan dari pellet *Bacillus* (filtrat)

E = Efisiensi *removal* isolat yang telah dipisahkan.

### 3.2.6. Viabilitas *Bacillus*

Isolat yang telah terpapar  $\text{CdCl}_2$  24 jam diambil 100  $\mu\text{L}$  dan diinokulasikan dengan metode *pour plate* pada medium *Nutrient Agar* (NA) tanpa  $\text{CdCl}_2$ . Koloni yang tumbuh merupakan isolat yang mempunyai viabilitas terhadap pemaparan logam Cd. Viabilitas dihitung dengan metode CFU (Colony Forming Unit), (Harley & Prescott, 2002).

### 3.3. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian dilakukan dengan metode deskriptif kualitatif untuk uji resisten logam Cd dan metode kuantitatif untuk uji *bioremoval* Cd.

Rancangan penelitian untuk metode kuantitatif menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan 3 isolat dan 3 konsentrasi Cd yang berbeda serta 2 kali ulangan. Adanya perbedaan diantara perlakuan di analisis dengan *Analysis of*



*Varians* (ANOVA) pada taraf kepercayaan ( $p= 5\%$ ). Jika ada perbedaan dilakukan uji signifikansi dengan uji beda nyata terkecil (BNT).

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Rekonfirmasi Genus *Bacillus*

Bakteri yang digunakan adalah isolat A6, DA11, S1, S6, dan SS19 yang diisolasi dari Kalimas Surabaya dan merupakan genus *Bacillus* (Zulaika dkk, 2012), sebagai pembanding digunakan *Bacillus cereus* ATCC 1178. Uji rekonfirmasi genus *Bacillus* dilakukan untuk memastikan bahwa isolat yang digunakan adalah benar-benar genus *Bacillus*.

Berdasarkan hasil *profil matching* sesuai karakter kunci genus *Bacillus*, isolat A6, DA11, S1, S6, dan SS19 mempunyai sel berbentuk batang, bersifat Gram-positif, bersifat motil, mampu menghasilkan endospora, bersifat aerob dan anaerob fakultatif, kemoorganotrof dan memiliki enzim katalase (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil Uji Rekonfirmasi Isolat

Karakter Kunci Genus <i>Bacillus</i> *	Isolat				
	A6	DA11	S1	S6	SS19
Bentuk batang	+	+	+	+	+
Gram positif	+	+	+	+	+
Motil	+	+	+	+	+
Endospora	+	+	+	+	+
Aerob/Fakultatif	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-
Anaerob	+	+	+	+	+
Kemoorganotrof	+	+	+	+	+
Katalase	+	+	+	+	+

\*Holt *et al.*, 1994

Berdasarkan Holt *et al.* (1994), Genus *Bacillus* merupakan bakteri yang berbentuk batang lurus dan memiliki ukuran 0,5-2,5 x 1,2-10  $\mu\text{m}$ . Genus bakteri ini tergolong dalam gram positif dan bersifat motil karena memiliki flagel peritrichous. *Bacillus*



memiliki endospora berbentuk oval atau terkadang berbentuk silinder. Endospora bersifat resisten terhadap kondisi yang tidak menguntungkan. *Bacillus* tergolong aerob atau fakultatif anaerob, kemoorganotrof dengan fermentasi dan katalase positif. Dari hasil uji konfirmasi di atas dapat dipastikan bahwa isolat A6, DA11, S1, S6, dan SS19 adalah genus *Bacillus*.

#### 4.2 Resistensi dan *Range Finding Test Bacillus* terhadap Logam Cd

Hasil uji resistensi yang diperoleh menunjukkan semua isolat *Bacillus* tumbuh sangat baik pada medium nutrient agar yang mengandung logam  $\text{CdCl}_2$  sampai dengan 30 mg/L. Sedangkan pada konsentrasi 40 mg/L semua isolat *Bacillus* tumbuh baik kecuali isolat *Bacillus* A6 dan S6. Pada konsentrasi 50 mg/L hanya isolat *Bacillus* DA11 dan *B. cereus* yang tumbuh dengan pertumbuhan koloni yang kurang baik, sedangkan isolat A6, S6, S1 dan SS19 tidak tumbuh sama sekali. Hasil uji resistensi dapat dilihat dalam Tabel 4.2 dan Gambar 4.1.

Tabel 4.2 Resistensi *Bacillus* pada media nutrisi agar mengandung logam  $\text{CdCl}_2$

Isolat <i>Bacillus</i>	Pertumbuhan isolat <i>Bacillus</i> pada medium yang mengandung $\text{CdCl}_2$ (mg/L)				
	10	20	30	40	50
A6	+++	+++	+++	-	-
DA11	+++	+++	+++	++	+
S1	+++	+++	+++	++	-
S6	+++	+++	+++	-	-
SS19	+++	+++	+++	+	-
<i>B. cereus</i>	+++	+++	+++	++	+

Keterangan: +++ (sangat baik), ++ (baik), + (kurang baik), - (tidak tumbuh)

Bakteri mempunyai resistensi terhadap logam Cd karena pada bakteri mempunyai gen resisten cadmium yakni gen *cad operon* yang terletak di dalam plasmid (Silver, 1996).

Mekanisme resistensi bakteri terhadap logam berat kadmium (Cd) dapat juga dilakukan dengan bantuan protein metallothionein, ion logam berat yang bermuatan positif akan berikatan dengan kelompok gugus (-SH) pada protein metallothionein yang mempunyai muatan negatif sehingga dapat menghambat aktivitas dan fungsi enzim yang mengandung gugus (-SH). Kation juga dapat dipisahkan menjadi senyawa kompleks dengan tiol, sehingga toksisitas beberapa ion logam berat dapat dikurangi atau bahkan hilang (Nies, 1999). Protein metallothionein yang berikatan dengan logam dalam sel bakteri memiliki batas maksimum. Hal ini direspon bakteri dengan meningkatkan pembelahan sel untuk memperbanyak produksi protein metallothionein. Menurut Colak *et al.* (2011) bakteri Gram positif memiliki kemampuan lebih tinggi dalam mengikat logam dibandingkan bakteri Gram negatif disebabkan adanya gugus karboksil yang lebih banyak pada dinding sel bakteri Gram positif.

Berdasarkan hasil uji resisten di atas isolat *Bacillus* yang dipilih adalah isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11. Isolat *Bacillus* S1 dan DA11 dipilih sebab kedua isolat tersebut mampu mentoleransi logam CdCl<sub>2</sub> sampe dengan konsentrasi 40 mg/L dengan baik, sedangkan pada penilaian terdahulu resisten terhadap merkuri sampai dengan 5mg/L (Zulaika *et al.*, 2013). Berdasarkan Tabel 4.2 dan *range finding test* maka konsentrasi CdCl<sub>2</sub> untuk perlakuan *bioremoval* adalah 10, 20 dan 30 mg/L.

#### 4.3 Viabilitas *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 Terpapar Logam Cd

Hasil kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 pada media *nutrien broth* yang terpapar logam Cd dengan konsentrasi 10, 20 dan 30 mg/L menunjukkan pola pertumbuhan



yang hampir sama dengan pola pertumbuhan isolat pada medium tanpa logam (Gambar 4.1).

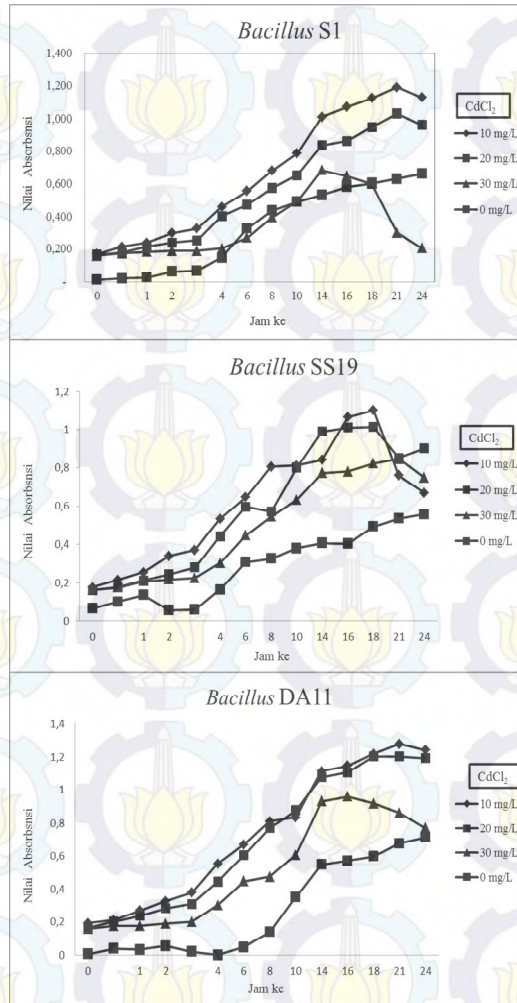
Berdasarkan Gambar 4.2, fase lag ketiga isolat *Bacillus* yang terpapar logam lebih lambat dibanding pada medium tanpa logam. Hal ini terjadi karena masing-masing isolat sebelumnya ditumbuhkan dalam medium tanpa logam, kemudian dipindah ke medium *nutrien broth* yang ditambah dengan logam Cd. Penambahan logam Cd menyebabkan adanya adaptasi terhadap cekaman sehingga terjadi perlambatan fase lag. Semakin tinggi konsentrasi logam Cd yang dipaparkan maka fase lag akan semakin panjang. Menurut Harley & Prescott (2002) inokulasi kultur dari medium yang berbeda dapat memperpanjang fase lag.

Penambahan logam  $\text{CdCl}_2$  dalam medium menyebabkan fase kematian lebih singkat dibandingkan dengan medium tanpa logam  $\text{CdCl}_2$ . Fase kematian isolat *Bacillus* terjadi lebih cepat pada konsentrasi logam  $\text{CdCl}_2$  30 mg/L dibandingkan 20, 10 dan 0 mg/L. Hal ini disebabkan tingginya konsentrasi paparan logam tidak diimbangi dengan penambahan nutrisi yang ada pada medium yang cenderung tetap. Paparan logam mengakibatkan bakteri merespon dengan meningkatkan jumlah pembelahan sel untuk memproduksi protein metallothionein yang mengandung gugus sulfhidril (-SH). Menurut Almeida *et al.* (2009) logam Cd merupakan logam berat yang memiliki efek toksisitas tinggi bagi organisme, bahkan pada tingkat konsentrasi yang rendah.

Logam berat dalam sel dapat berikatan dengan gugus sulfhidril (-SH) dari asam amino sehingga menyebabkan terhambatnya kinerja enzim yang mempunyai gugus sulfhidril (-SH) dimana enzim tersebut mempunyai peranan penting dalam proses metabolisme sel. Selain itu, kerja ion-ion fisiologis dapat terganggu oleh adanya logam berat, seperti logam Cd yang mengganggu kinerja ion Zn atau Ca. Hal ini disebabkan adanya kesamaan bilangan valensi antara logam Cd, Zn dan Ca. Senyawa oksianion logam berat apabila tereduksi dalam sel dapat menghasilkan radikal bebas yang akan berikatan dengan



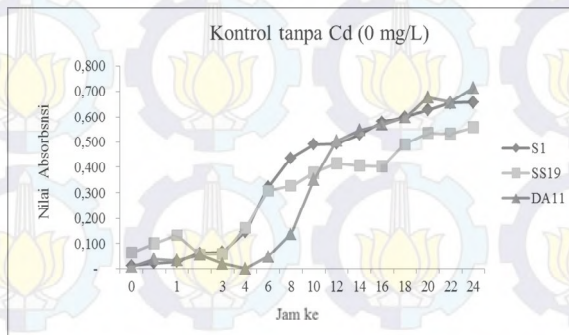
Deoxyribonucleic Acid (DNA) sehingga dapat mengakibatkan mutasi (Nies, 1999).



Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 pada media nutrien broth yang tercemar logam  $\text{CdCl}_2$

#### 4.4 Starter Isolat *Bacillus* ( $\mu$ maksimum)

Starter isolat  $\mu$  maksimum merupakan umur perlakuan isolat untuk uji *bioremoval* yang didapatkan berdasarkan kurva pertumbuhan pada media NB tanpa  $\text{CdCl}_2$ . Pertumbuhan ketiga isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama. Pola pertumbuhan *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 menunjukkan adanya fase lag, eksponensial dan stasioner (gambar 4.2).



Gambar 4.2 Kurva pertumbuhan *Bacillus* S1, SS19, dan DA11 sebagai starter

Fase lag isolat S1 dan SS19 terjadi pada jam 0-3 setelah inkubasi, sedangkan isolat DA11 terjadi pada jam 0-4 setelah inkubasi. Fase lag merupakan fase awal yang memiliki ciri tidak adanya pertumbuhan populasi, sel mengalami perubahan dalam komposisi kimiawi, bertambah ukurannya, dan substansi intraselulernya bertambah (Pelczar, 1986). Fase lag pada kurva pertumbuhan yang tanpa logam terjadi karena adanya perpindahan isolat uji dari medium *nutrient agar* yang bersifat padat kedalam medium *nutrient broth* yang bersifat cair. Perpindahan medium padat ke cair menyebabkan sel bakteri harus beradaptasi ke jenis medium baru. Hal ini sesuai dengan Harley & Prescott. (2002) yang menyatakan inokulasi kultur dari medium yang berbeda dapat memperpanjang fase lag.



Fase eksponensial isolat *Bacillus* S1 dan SS19 terjadi pada jam ke 3-22, sedangkan isolat *Bacillus* DA11 terjadi pada jam ke 4-22 setelah inkubasi. Fase eksponensial merupakan fase yang terjadi ketika sel membelah dengan laju yang konstan, massa menjadi dua kali lipat dengan laju yang sama, aktivitas metabolik seimbang, dan pertumbuhan seimbang (Pelczar, 1986).

Fase stasioner ketiga isolat terjadi mulai jam ke-22. Hal ini ditandai dengan jumlah sel cenderung tetap. Pada fase stasioner nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri dalam pertumbuhannya mulai habis (Pelczar, 1986). Fase kematian isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 tidak terlihat sebab pengukuran OD untuk memvisualisasikan kurva pertumbuhan hanya dilakukan selama 24 jam.

Berdasarkan kurva pertumbuhan yang didapat, diketahui umur perlakuan ( $\mu$  maksimum) ketiga isolat adalah jam ke-12. Jam ke-12 merupakan fase eksponensial, yaitu fase dimana mikroorganisme tumbuh dan membelah pada laju maksimal. Kultur yang sedang dalam fase eksponensial sering digunakan untuk pengujian fisiologis maupun biokimia pada bakteri (Harley & Prescott, 2002).

#### **4.5 Uji Bioremoval Logam CdCl<sub>2</sub>**

Uji *bioremoval* dilakukan untuk mengetahui besarnya konsentrasi logam Cd<sup>2+</sup> yang dapat dihilangkan dari media kultur oleh isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11. Konsentrasi perlakuan logam CdCl<sub>2</sub> tanpa inokulum mengalami penurunan setelah diukur menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectroscopy*). Konsentrasi 10 mg/L menjadi 6,527 mg/L, 20 mg/L menjadi 15,092 mg/L dan 30 mg/L menjadi 23,75 mg/L. (Tabel 4.3)



Tabel 4.3 Konsentrasi logam Cd tanpa inokulum

Konsentrasi Perlakuan Cd (mg/L)	Konsentrasi Cd terukur AAS (mg/L)*
10	6,527
20	15,092
30	23,75

\* Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi Baristand Industri Surabaya

Logam memiliki kemampuan berikatan dengan komponen medium *Nutrient Broth*. Dalam komponen medium *Nutrient Broth* terdapat pepton dan *meat extract*. Pepton merupakan protein yang memiliki susunan monomer asam amino. Menurut Roberts *et al.* (1977) asam amino mempunyai gugus fungsional amina ( $\text{NH}_2^+$ ) dan karboksil ( $\text{COO}^-$ ). Gugus karboksil ( $\text{COO}^-$ ) pada protein yang bermuatan negatif akan bereaksi dengan logam berat  $\text{Cd}^{2+}$  yang bermuatan positif membentuk ikatan ligan (Manahan, 1977). Menurut Rao *et al.* (1998) Pengikatan pepton (protein) dengan logam  $\text{Cd}^{2+}$  menyebabkan terbentuknya metalloprotein sehingga keberadaan logam  $\text{Cd}^{2+}$  dalam medium berkurang. Logam  $\text{Cd}^{2+}$  memiliki afinitas yang tinggi terhadap unsur S pada asam amino yang menyebabkan logam  $\text{Cd}^{2+}$  menggantikan ikatan belerang (S) dalam asam amino atau enzim (Manahan, 1977).

Berdasarkan pengukuran tersebut konsentrasi perlakuan logam  $\text{Cd}^{2+}$  untuk *bioremoval* adalah 6,527; 15,092 dan 23,75 mg/L. Isolat yang berumur  $\mu$  maksimum dihitung kepadatan selnya menggunakan *haemocytometer* sebelum dipapar logam  $\text{Cd}^{2+}$  sesuai dengan konsentrasi. Kepadatan sel isolat *Bacillus* S1 pada saat  $\mu$  jam sebesar  $2,53 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup>, SS19 sebesar  $8,11 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup> dan DA11 sebesar  $7,69 \times 10^6$  sel/cm<sup>3</sup>.

Hasil uji *bioremoval* menunjukkan bahwa isolat *Bacillus* SS19 dan DA11 menunjukkan aktifitas *bioremoval*  $\text{Cd}^{2+}$  semakin besar seiring besarnya konsentrasi yang dipaparkan tetapi

efisiensi untuk *bioremoval* oleh isolat *Bacillus bioremoval*-nya semakin kecil (Tabel 4.4). *Bioremoval* Cd<sup>2+</sup> oleh *Bacillus* S1 setelah diukur dengan AAS menunjukkan hasil *bioremoval* negatif sehingga data tidak dapat dianalisis sehingga S1 dilakukan pengukuran ulang dan hasilnya ditampilkan pada (Tabel 4.5).

Tabel 4.4 *Bioremoval* Logam Cd oleh *Bacillus*

Isolat	Konsentrasi Cd terukur AAS (mg/L)*	Konsentrasi sisa (mg/L)	Konsentrasi <i>bioremoval</i> (mg/L)	Efisiensi <i>bioremoval</i> (%)
DA11	6,527	4,19	2,337	35,81
	15,092	11,78	3,312	21,95
	23,75	20,02	3,73	15,71
S1	6,527	7,835	-1,308	-20,04
	15,092	20,348	-5,256	-34,83
	23,75	23,94	-0,19	-0,80
SS19	6,527	4,842	1,685	25,82
	15,092	12,74	2,352	15,58
	23,75	24,132	-0,382	-1,61

\* Laboratorium Balai Riset dan Standarisasi Industri Surabaya

\*\* Peraturan Menteri Negara Lingkungan Hidup No.3 Tahun 2010

Berdasarkan Tabel 4.4 isolat *Bacillus* DA11 mampu *removal* logam Cd relatif lebih besar dibanding isolat SS19 dengan efisiensi *bioremoval* yang lebih besar pula. Yaitu dengan *bioremoval* maksimum 3,73 mg/L pada paparan 23,75 mg/L. Efisiensi *bioremoval* maksimal 35,81% dari paparan 6,527 mg/L.

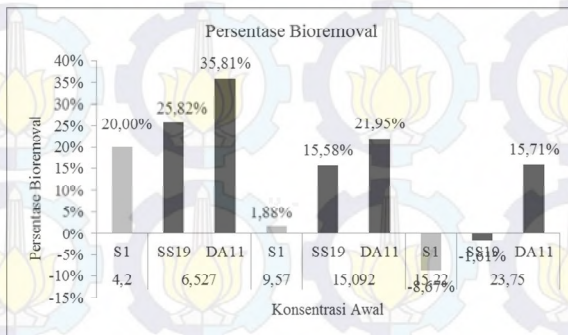


Tabel 4.5 Uji ulang *Bioremoval* S1

Isolat	Konsentrasi Perlakuan Cd (mg/L)	Konsentrasi Cd terukur AAS (mg/L)*	Konsentrasi sisa (mg/L)	Konsentrasi bioremoval (mg/L)	Efisiensi bioremoval (%)
S1	10	4,2	3,36	0,84	20,00
	20	9,57	9,39	0,18	1,88
	30	15,22	16,54	-1,32	-8,67

\* Laboratorium Balai Riset dan Standarisasi Industri Surabaya

Berdasarkan Tabel 4.5 konsentrasi perlakuan  $\text{CdCl}_2$  setelah diukur dengan AAS menghasilkan konsentrasi  $\text{Cd}^{2+}$  sebesar 4,2 mg/L dari 10mg/L; 9,57 mg/L dari 20 mg/L dan 15,22 mg/L dari 30 mg/L sehingga hasil *bioremoval* tidak dapat dibandingkan dengan *bioremoval*  $\text{Cd}^{2+}$  pada isolat *Bacillus* S1 dan DA11. Berdasarkan hal tersebut dilakukan pembandingan efisiensi *bioremoval* terhadap masing-masing isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 (Gambar 4.4).



Gambar 4.3 Efisiensi *bioremoval* (%)  $\text{Cd}^{2+}$  oleh isolat S1, DA11 dan SS19

Berdasarkan Gambar 4.4 efesiensi *bioremoval* logam  $\text{Cd}^{2+}$  oleh isolat *Bacillus* menunjukkan ketiga isolat mampu melakukan *bioremoval* terhadap logam  $\text{Cd}^{2+}$  yang dipaparkan dengan



efisiensi yang relatif berbeda untuk masing-masing konsentrasi  $\text{Cd}^{2+}$  dan isolat *Bacillus*.

Isolat *Bacillus* DA 11 memiliki efisiensi *bioremoval* paling tinggi dibanding kedua isolat lainnya dengan persentase 35,81%, 21,95% dan 15,71 pada konsentrasi 6,527; 15,092 dan 23,75 mg/L sedangkan kedua isolat *Bacillus* S1 dan SS19 cenderung lebih rendah. Hal ini menunjukkan bahwa isolat DA11 memiliki potensi yang lebih besar dalam melakukan aktivitas *bioremoval* terhadap logam  $\text{Cd}^{2+}$ .

Data *bioremoval* yang didapat berdasarkan kaidah statistik tidak dapat dianalisis dengan *Analysis of Varians* (ANOVA) sehingga digunakan analisis kualitatif kecenderungan.

Mekanisme *Bioremoval* logam Cd dapat dilakukan bakteri dengan beberapa mekanisme. (1) Mengakumulasi logam berat kemudian mengurangi kadar toksisitas logam berat yang berlebih dengan mekanisme transport aktif pompa efflux. (2) Logam berat bermuatan positif (kation) membentuk senyawa kompleks dengan tiol yang mengandung gugus (-SH) sehingga terbentuk ikatan logam. (3) Ion logam mengalami proses reduksi.

(Nies, 1999)

Pada bakteri Gram positif logam  $\text{Cd}^{2+}$  memiliki jalur masuk ke dalam sel melalui  $\text{Mn}^{2+}$  transport. Adanya kesamaan bilangan valensi  $2^+$  antara logam  $\text{Mn}^{2+}$  dengan  $\text{Cd}^{2+}$  menyebabkan logam Cd mampu masuk ke dalam sel (Nies, 2003). Logam Cd yang terakumulasi di dalam sel memiliki sifat reaktif yang sangat tinggi dan dapat menginaktivkan berbagai macam aktivitas enzim yang diperlukan oleh sel (Jonak *et al*, 2004). Gen *cad operon* mampu mengekspresikan protein CadC yang akan mengaktifkan pompa efflux. Pompa efflux akan mengeluarkan logam Cd dengan bantuan ATP keluar sel (Nies, 2003).

#### 4.6 Uji viabilitas *Bacillus* setelah terpapar Cd

Uji viabilitas (daya hidup) dilakukan untuk mengetahui apakah isolat *Bacillus* masih mampu tumbuh di medium *nutrien*

agar tanpa logam setelah dipapar logam Cd. Hasil uji viabilitas divisualisasikan dalam bentuk *Colony Forming Unit* (CFU), secara rinci ditampilkan pada Tabel 4.5

Tabel 4.6 Hasil Uji Viabilitas CdCl<sub>2</sub> *Bacillus* (CFU)

Isolat <i>Bacillus</i>	Konsentrasi Cd (mg/L) yang telah dipaparkan pada media <i>nutrien broth</i>		
	10	20	30
S1	>300 CFU	>300 CFU	166 CFU
SS19	>300 CFU	155 CFU	59 CFU
DA11	>300 CFU	>300 CFU	179 CFU

Berdasarkan Tabel 4.5, semua isolat *Bacillus* masih dapat tumbuh pada media *nutrien agar* tanpa logam Cd setelah terpapar logam Cd selama 24 jam. Koloni yang tumbuh semakin menurun seiring besarnya konsentrasi Cd yang dipaparkan. *Bacillus* DA11 mempunyai viabilitas yang paling baik dibanding *Bacillus* S1 dan SS19.

Hasil uji viabilitas menggunakan metode *pourplate* memiliki perbedaan dengan hasil viabilitas menggunakan kurva pertumbuhan. Hal ini disebabkan adanya perubahan wujud medium yang digunakan pada saat uji viabilitas. Pada uji viabilitas metode *pourplate* yang direpresentasikan dengan CFU hanya bakteri yang hidup saja yang tumbuh dan teramati. Sedangkan pada uji viabilitas menggunakan kurva pertumbuhan dilakukan pengukuran *optical density* saat viabilitas yang direpresentasikan dengan kurva pertumbuhan, bakteri yang terukur adalah bakteri yang hidup dan mati (Harley & Prescott, 2002). Semakin tinggi angka CFU semakin besar kemampuan *bioremoval*-nya terhadap logam Cd, terlihat pada isolat *Bacillus* DA11.

Menurut Partanto dan Dahlan (1991) viabilitas merupakan kemampuan dan daya hidup suatu makhluk hidup yang dapat ditunjukkan dengan jumlah yang tumbuh ataupun biomassa. Jonak *et al.* (2004) menjelaskan bahwa kadmium tidak diketahui



memiliki fungsi biologis di dalam sel tetapi memiliki sifat reaktif yang sangat tinggi dan dapat menginaktivkan berbagai macam aktivitas enzim yang diperlukan oleh sel, sehingga keberadaan Cd dapat mempengaruhi metabolisme bakteri.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka kesimpulan dari penelitian adalah

1. Semua isolat *Bacillus* resisten pada media *nutrien agar* dan *nutrien broth* yang mengandung logam  $\text{Cd}^{2+}$  sampai dengan 30 mg/L.
2. Isolat *Bacillus* DA11 dapat mengurangi konsentrasi  $\text{Cd}^{2+}$  di medium kultur paling besar dibanding isolat *Bacillus* S1 dan SS19 yaitu 3,73 mg/L dari konsentrasi 23,75 mg/L yang dipaparkan. Dengan efisiensi *bioremoval* maksimal 35,81% dari pemaparan 6,527 mg/L.

#### 5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya diharapkan isolat *Bacillus* DA11 dapat digunakan sebagai agen akumulator logam Cd dalam IPAL (Instalasi Pengolahan Air Limbah).

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## DAFTAR PUSTAKA

Alfian. 2005. Analisis Kadar Logam Kadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) dari Kerang yang Diperoleh dari Daerah Belawan secara Spektrofotometer Serapan Atom. **Jurnal Sains Kimia** Vol 9, No.2: 73-76

Allen, E.H. 1995. *Metal Contaminated Aquatic Sediments*. Ann Arbor Oress.Inc 121 South Main Street, Chelsea, Michigan.

Almeida, J. A., Barreto, R.E., Novelli, L. B., Castro, F. J., dan Moron, S. E. 2009. Oxidative Stress Biomarkers and Agressive Behavior in Fish Exposed to Aquatic Cadmium Contamination. **Neotropical Ichthyology** 7: 103-108

Boboce, A.C., Fertig, E.T., Pislea, M., Seremet, T., Katona G., Magdalena Mocanu, I.O., Doaga, I.O., Radu, E., Horvath, J., Tanos, E., Katona, L., dan Katona E. 2008. Cadmium and Soft Laser Radiation Effects on Human T Cells Viability and Death Style Choises. **Romanian J. Biophys**, Vol. 18, pp, 179-193.

Chien, S.H., Carmona, G., Prochnow, L.L., dan Austin, E.R. 2003. Cadmium Availability from Granulated and Bulk-Blended Phosphate-Potassium Fertilizers. **J. Environ. Qual.** 32: 191111914

Colak, F., Atarb, N., Yazicioglua, D. dan Olgun, A. 2011. Biosorbption of lead from aqueous solution by Bacillus strains processing heavy-metal resistance. **Chemical Engineering Journal**, 173: 422 – 428

Daboor, S.M. 2014. Application of Bacterial Biomass as a Potential Heavy Metal Bioremoval Agent. **African Journal of Microbiology Research**. 8 (22): 2229-2237.



Dailianis, S dan Kaloyianni, M. 2004. Cadmium Induces Both Pyruvate Kinase and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger Activity Through Protein Kinase C Mediated Signal Transduction, in Isolated Digestive Gland Cells of *Mytilus galloprovincialis* (L.). **The Journal of Experimental Biology**, Vol 207: 1665-1674.

Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C., dan Egwurugwu, J.N. 2007. Heavy Metal Pollution and Human Biotoxic Effects. Full Length Research Paper. **International Journal of Physical Sciences**, Vol 2 (5): 112-118

Fardiaz S. 1992. **Mikrobiologi Pangan I**. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta

Hatmanti A. 2000. Pengenalan *Bacillus* SPP. Balitbang Lingkungan Laut, Puslitbang Oseanologi-LIPI, Jakarta. **Oseana**, Volume XXV, Nomor 1, 2000 : 31-41

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, H. A., Staley, J.T., dan Williams, S.T. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9<sup>th</sup> Edition**. Baltimore: William and Wilkins

Jonak, C., Nakagami, H., dan Hirt, H. 2004. Heavy Metal Stress. Activation Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. **Plant Physiology** 136: 3276-3283.

Kim, J.B., Park, J.K., Kim, M.S., Hong, S.C., Park, J.H. dan Hwan, D. 2011. Genetic diversity of emetic/toxin producing *Bacillus cereus* Korean strains. **International Journal of Food Microbiology**, 150: 66 – 72

Koes I. 2006. **Mikrobiologi Mengungkap Dunia Mikroorganisme**. Jilid 2. Erlangga. Jakarta.

Manahan, S.E. 1977. **Environmental Chemistry**. Second Edition. Boston: Willard Press

Misra, T.K. 1992. **Heavy Metals Bacteria Resistances**. Encyclopedia of Microbiology 2. Academic Press. Toronto.

Naryaningsih A. 2005. Keaktifan *Bacillus cereus* (Frakland and Frakland) ATCC 11778 (Bakteri Gram Positif) dan *Pseudomonas aeruginosa* (Schoeter) ATCC 27853 (Bakteri Gram Negatif) Sebagai Bioakumulator Kadmium. **Tesis**. UNDIP Semarang.

Nies, D.H. 1999. Microbial heavy metal resistance: molecular biology and utilisation for biotechnological processes. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 51: 730-750.

Nies, D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiol. Rev.** 27, 313-339

Ozdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolausc, B., dan Guneva, K. (2009). Biosorbption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solution by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub.sp. decaninus and *Geobacillus thermoleovorans* sub.sp. stromboliensis: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **Chemical Engineering Journal**, 152: 195 – 206.

Palar, H. 2008. **Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat**. Jakarta: Rineka Cipta

Partanto dan Dahlan. 1991. **Kamus Ilmiah Popular**. Surabaya: Arloka

Patrick, L. 2003. Toxic Metals and Antioxidants. Part II the Role of Antioxidant in Arsenic and Cadmium Toxicity – Toxic Metals part II. **Review**. Alternativer Medicine Review.

Pelczar, M.J dan Chan E.C.S. 1986. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Jakarta. UI Press



Pelczar, M.J dan Chan E.C.S. 2005. **Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jakarta.** UI Press.

Prescott, L. M., Harley, J. P., dan Klein, D. A. 2002.. **Microbiology, 5<sup>th</sup> Edition.** New York: McGraw-Hill.

Prescott, L. M., Harley, J. P., dan Klein, D. A. 2002... **Microbiology, Seventh Edition.** New York: McGraw-Hill.

Rathnayake, I. V. N., Megharaj, M., Bolan, N. dan Naidu, R. (2009). Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. World Academy of Science, **Engineering and Technology** 53: 1185 – 1189.

Roberts, John D. and Caserio, Marjorie C. (1977) **Basic Principles of Organic Chemistry, second edition.** W. A. Benjamin, Inc.

Silver, S. and Phung, L.T. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new supprises. Annu. Rev. **Microbiol.**50: 753-789.

Sochor, J., Zitka, O., Hynek, D., Jilkova, E., Krejcova, L., Trnkova, L., Adam, V., Hubalek, J., Kynicky, J., Vrba, R., and Kizek, R. 2011. Bio-Sensing of Cadmium (II) Ions Using *Staphylococcus aureus*. **Sensors Journal.** 11: 10638-10663.

Suhendrayatna. 2001. Bioremoval Logam Berat dengan Menggunakan Mikroorganisme; Suatu Kajian Kepustakaan. **Seminar Bioteknologi.** Tokyo: Sinergi Forum-Institut of Technology.

Waluyo L. 2007. **Mikrobiologi Umum.** Edisi Revisi. Balai Pustaka ; Jakarta

Widowati W, Sastiono A, Jusuf R. R. 2008. **Efek Toksik Logam Pencegahan dan Penanggulangan Pencemaran**. Penerbit Andi. Yogyakarta.

Yilmaz E. Ince and Ensari N.Y. 2005. Cadmium biosorption by *Bacillus circulans* strain EB1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 21:777–779

Zulaika E., Luqman A., Arinda T., dan Sholikah U. 2012. Bakteri Resisten Logam Berat yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator. **Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development**. Teknik Lingkungan, FTSP-ITS, 21 Februari 2012



**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## Lampiran 1 : Komposisi Medium NA

### **Komposisi Medium NA**

Peptone .....	5.0 gram
Beef extract .....	3.0 gram
Agar .....	15.0 gram
Distilled water .....	1,000 ml
Diautoklaf dengan tekanan 121 lb selama 15 menit	

(Harley and Prescott, 2002)

## Lampiran 2: Komposisi Medium NB

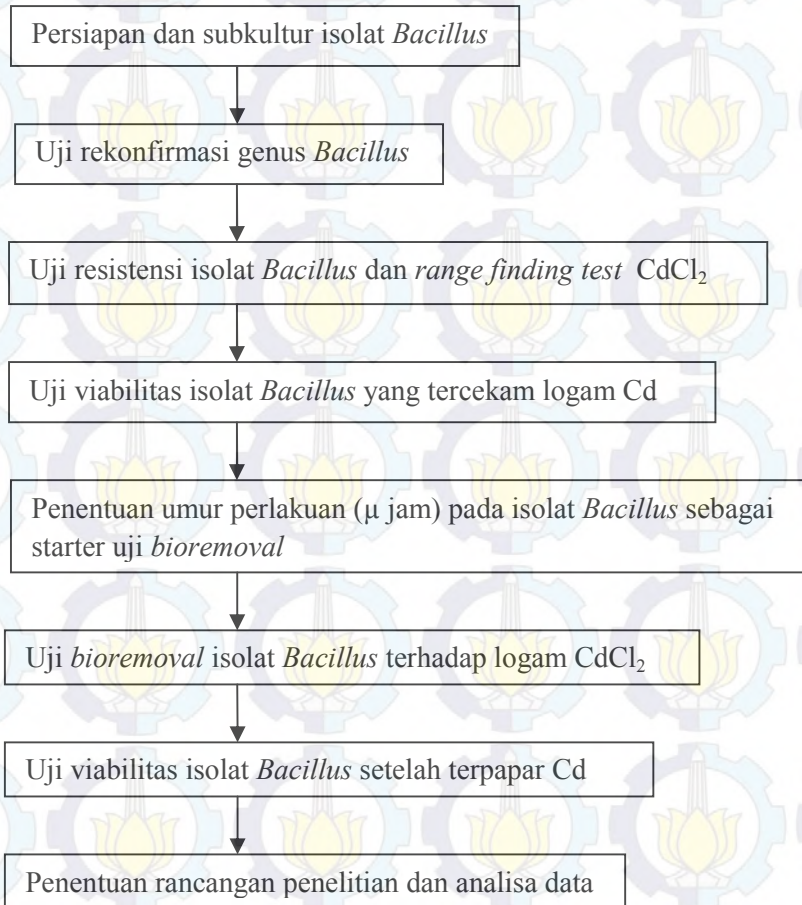
### **Komposisi Medium NB (pH 7.0)**

Peptone .....	5.0 gram
Beef extract .....	3.0 gram
Distilled water .....	1,000 ml
Diautoklaf dengan tekanan 121 lb selama 15 menit	

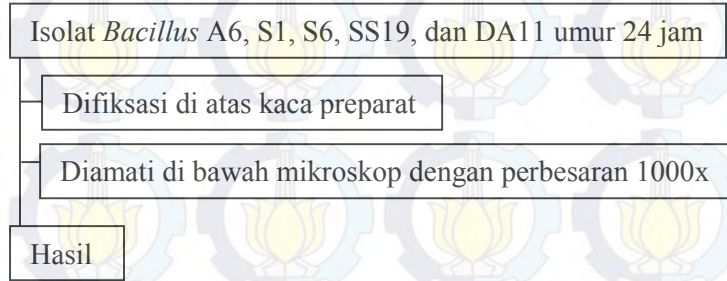
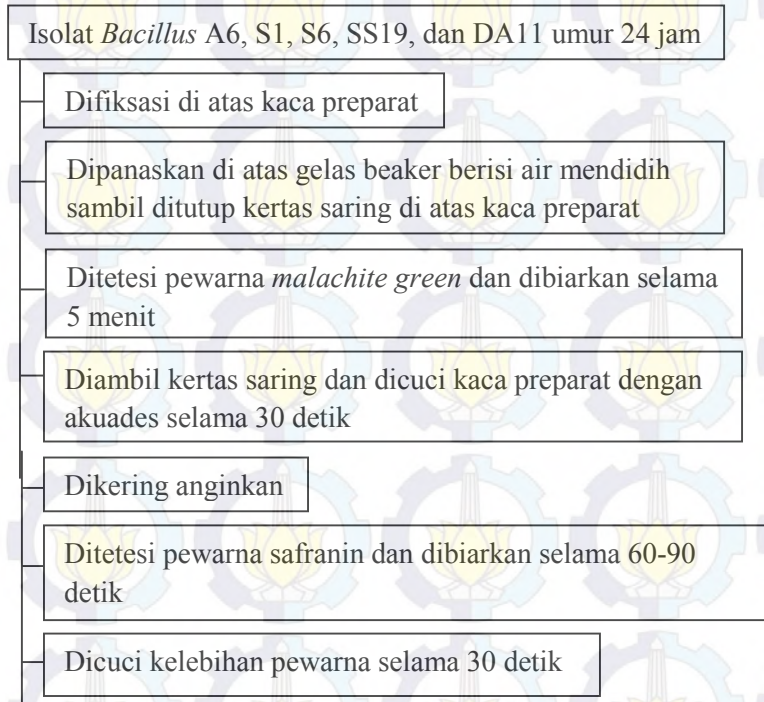
(Harley and Prescott, 2002)



## Lampiran 3: Skema Kerja



## Lampiran 4: Skema Kerja Uji Rekonfirmasi

Pengamatan MorfologiPewarnaan Endospora



Dikering anginkan

Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x

Hasil

### Pewarnaan Gram

Isolat *Bacillus* A6, S1, S6, SS19, dan DA11 umur 24 jam

Difiksasi di atas kaca preparat

Ditetsi *crystal violet* dan didiamkan selama 30 detik

Dicuci kelebihan pewarna dengan akuades selama 5 detik dan dikering anginkan

Ditetsi iodin dan didiamkan selama 60 detik

Dicuci kelebihan pewarna dengan akuades selama 5 detik dan dikering anginkan

Ditetsi alkohol 95% perlahan selama 15 detik kemudian dicuci dengan akuades selama 5 detik

Ditetsi safranin dan didiamkan selama 60 detik

Dicuci kelebihan pewarna dengan akuades selama 5 detik dan dikering anginkan

Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x

Hasil

Uji Katalase

Isolat *Bacillus* A6, S1, S6, SS19, dan DA11 umur 24 jam

Diteteskan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% di atas kaca preparat dan diinokulasikan isolat



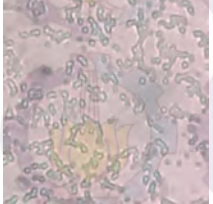
Diamati gelembung yang terbentuk

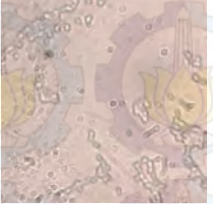
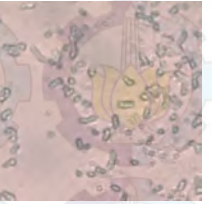
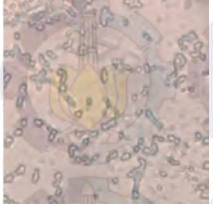
Hasil




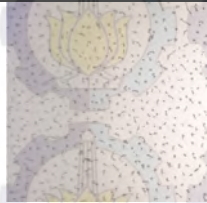
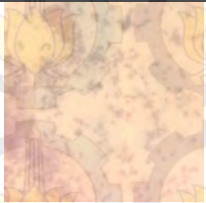
# Lampiran 5: Foto hasil uji rekonfirmasi

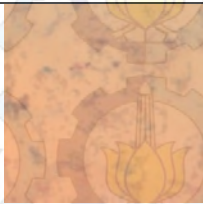
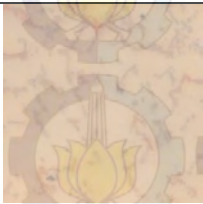

## Pengamatan morfologi isolat *Bacillus*

Isolat	A6	S1	S6
Gambar			

Isolat	SS19	DA11	<i>B.cereus</i> ATCC 1179
Gambar			

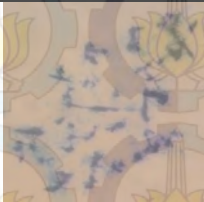

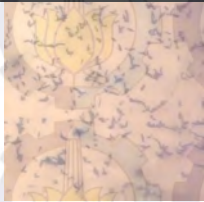
Pewarnaan endospora isolat *Bacillus*




Isolat	A6	S1	S6
Gambar			

Isolat	SS19	DA11	<i>B.cereus</i> ATCC 1179
Gambar			

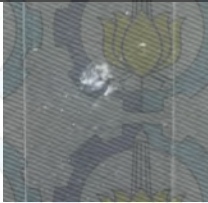







Pewarnaan Gram isolat *Bacillus*

Isolat	A6	S1	S6
Gambar			

Isolat	SS19	DA11	<i>B.cereus</i> ATCC 1179
Gambar			

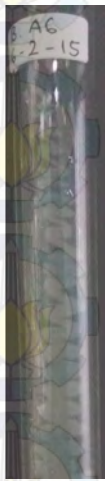
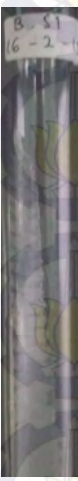




Uji katalase isolat *Bacillus*

Isolat	A6	S1	S6
Gambar			

Isolat	SS19	DA11	<i>B.cereus</i> ATCC 1179
Gambar			



Lampiran 6: Hasil subkultur isolat *Bacillus*

Isolat	A6	S1	S6	SS19	DA11	<i>B. cereus</i> ATCC11 78
Gambar						

Lampiran 7: Perhitungan umur perlakuan *bioremoval* ( $\mu$  jam) dan perhitungan jumlah sel/ml

Perhitungan Umur Perlakuan *Bioremoval* ( $\mu$  jam) Isolat *Bacillus*

$$\mu \text{ jam} = \frac{\text{fase eksponensial akhir} - \text{fase eksponensial awal}}{2}$$

$$+ \text{fase eksponensial awal} = \frac{18-6}{2} + 6 = 6 + 6 = 12$$

Jadi, umur perlakuan *bioremoval* isolat *Bacillus* adalah 12 jam.

Perhitungan Jumlah Sel/ml



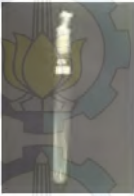



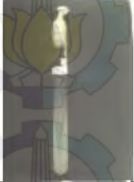



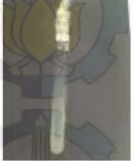







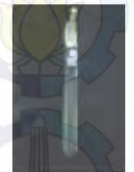
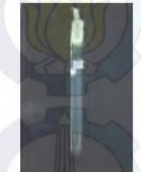

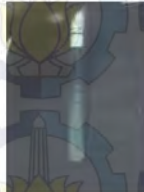

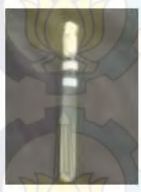
$$\text{jumlah} \frac{\text{sel}}{\text{ml}} = \frac{\text{jumlah sel}}{0,02} \times 10^3$$

$$\text{jumlah} \frac{\text{sel}}{\text{ml}} \text{ isolat 'S1} = \frac{50,2}{0,02} \times 10^3 = 2,53 \times 10^6$$

$$\text{jumlah} \frac{\text{sel}}{\text{ml}} \text{ isolat SS19} = \frac{162,2}{0,02} \times 10^3 = 8,11 \times 10^6$$

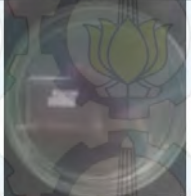

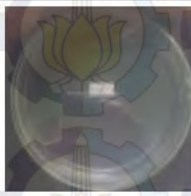
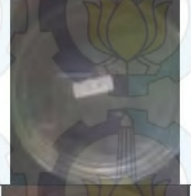





$$\text{jumlah} \frac{\text{sel}}{\text{ml}} \text{ isolat DA11} = \frac{153,8}{0,02} = 7,69 \times 10^6$$

Lampiran 8: Foto Hasil Uji Resistensi *Bacillus* Terhadap  $\text{CdCl}_2$ 

Isolat	Konsentrasi $\text{CdCl}_2$ (mg/L)			
	0,1	30	40	50
A6				
B.Cereus ATCC 1178				
DA11				
S1				
S6				
SS19				



Lampiran 9: Foto Hasil Uji Viabilitas *Bacillus* setelah terpapar  $\text{CdCl}_2$

Isolat	Konsentrasi Cd yang telah dipaparkan (mg/L)		
	10	20	30
S1			
SS19			
DA11			

## BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Surabaya pada tanggal 05 Desember 1991. Anak terakhir dari tiga bersaudara ini memulai pendidikan dasar di SDN Tanjungan Gresik. SD-SMP di Gresik. Setelah lulus, ia memulai jenjang menengah pertama di SMPN 1 Driyorejo Gresik. Lulus SMP ia memulai jenjang menengah atas di SMAN 1 Driyorejo Gresik. Setelah lulus SMA pada tahun 2010, Laki-laki yang menyukai bidang astronomi (ruang angkasa), menggambar sketsa dan mendengarkan musik ini, sempat memutuskan untuk melanjutkan di bidang astronomi namun karena berbagai faktor, ia mengurungkan niat dan akhirnya melanjutkan di Jurusan Biologi FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya pada tahun 2011. Penulis mulai memiliki minat pada bidang Mikrobiologi pada saat semester ke 5. Selama kuliah laki-laki penyuka nasi goreng ini aktif dalam Kegiatan Himpunan Biologi ITS periode kepengurusan 2013-2014 sebagai Ketua Departement Sains dan Teknologi HIMABITS.

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Mekanisme bakteri resisten Cd..... 6
Gambar 4.1	Kurva Pertumbuhan <i>Bacillus</i> S1,SS19 dan DA11 tercekam logam Cd..... 23
Gambar 4.2	Kurva pertumbuhan <i>Bacillus</i> S1, SS19, dan DA11 sebagai starter..... 24
Gambar 4.3	Persentase <i>bioremoval</i> isolat S1, DA11 dan SS19..... 28



# Resistensi dan Viabilitas *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 pada Medium yang Terpapar Logam Kadmium (Cd)

Trio Verdian dan Dr. Enny Zulaika, MP.

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: enny@bio.its.ac.id

**Abstrak**— Keberadaan logam berat di lingkungan memiliki efek toksik. Upaya untuk mengurangi efek toksik di lingkungan salah satunya menggunakan mikroorganisme yang resisten logam berat. *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 resisten logam kadmium, apakah isolat *Bacillus* tersebut juga mempunyai viabilitas yang tinggi pada media yang terpapar logam Cd.

Uji rekonfirmasi untuk resistensi genus *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 menggunakan media *nutrient agar* yang mengandung  $\text{CdCl}_2$  dengan konsentrasi 10, 20 mg/L dan seterusnya sampai konsentrasi yang dapat ditoleransi isolat. Uji viabilitas dilakukan pada media *nutrient broth* yang dipapar  $\text{CdCl}_2$  dengan konsentrasi 10, 20 dan 30 mg/L. Viabilitas divisualisasi dengan bentuk kurva pertumbuhan

Semua isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 resisten pada media *nutrient agar* yang mengandung  $\text{CdCl}_2$  sampai dengan konsentrasi 30 mg/L.

**Kata Kunci** : *Bacillus*, Kadmium, Logam Berat, Resistensi

## I. PENDAHULUAN

KADMIUM merupakan unsur kimia dalam tabel periodik yang memiliki lambang Cd dan nomor atom 48 dengan masa jenis  $8,65 \text{ g/cm}^3$  [1]. Kadmium termasuk ke dalam golongan logam berat karena memiliki massa jenis lebih dari  $5 \text{ g/cm}^3$  [2]. Logam berat kadmium bersifat toksik bagi makhluk hidup walaupun dalam konsentrasi yang rendah dan tidak dapat didegradasi sehingga selalu ada di lingkungan dalam keadaan persisten [3].

Keberadaan kadmium di lingkungan diakibatkan oleh kegiatan antropogenik. salah satunya berasal dari industri *electroplating* [4]. Kadmium memiliki efek toksik yang sangat tinggi dan memiliki waktu paruh yang panjang di dalam tubuh organisme [5]. Efek toksik dari kadmium disebabkan antara kadmium dan gugus fungsional protein dapat membentuk ikatan ligan sehingga protein tersebut kehilangan fungsinya [6]. Kadmium tidak memiliki fungsi biologis di dalam sel tetapi memiliki sifat reaktif yang sangat tinggi dan dapat menginaktivkan berbagai macam aktivitas enzim yang diperlukan [7].

Upaya yang dilakukan dalam menanggulangi pencemaran logam berat dengan melakukan remediasi, salah satunya menggunakan mikroorganisme yang dikenal dengan metode bioremediasi. [8]. Beberapa bakteri resisten terhadap kadmium, di antaranya *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*

[9]. isolat *Bacillus* yang diisolasi dari Sungai Kalimas Surabaya resisten terhadap logam berat Cd tetapi belum diketahui viabilitasnya ketika tercekam Cd.

## II. METODOLOGI PENELITIAN

### A. Rekonfirmasi Uji Resistensi Isolat *Bacillus* Terhadap Cd

Isolat *Bacillus* umur 24 jam dengan kode S1, S6, SS19, DA11, A6, dan *Bacillus cereus* ATCC 1178 sebagai kontrol ditumbuhkan di pada media *nutrient agar*- $\text{CdCl}_2$  dengan metode *continue streak plate*. Konsentrasi  $\text{CdCl}_2$  yang digunakan mulai dari 10 mg/L meningkat sampai dengan konsentrasi yang dapat ditoleransi bakteri. Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap  $\text{CdCl}_2$ .

### B. Uji Viabilitas Isolat *Bacillus* yang Tercekam $\text{CdCl}_2$

Berdasar uji resistensi dipilih 3 isolat yang lebih resisten dibanding isolat yang lain untuk diuji viabilitasnya pada media *nutrient broth* yang mengandung  $\text{CdCl}_2$  dengan konsentrasi 10, 20 dan 30 mg/L.

Satu ose isolat diinokulasi secara aseptis ke dalam 10 ml media *nutrient broth* -Cd dan diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker*. Selanjutnya 10 ml kultur ditambahkan ke dalam 90 ml media *nutrient broth*-Cd dan diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker*. Diambil 20 ml kultur dan ditambahkan ke dalam 180 ml media *nutrient broth*-Cd dengan konsentrasi 10, 20 dan 30 mg/L dan diinkubasi selama 24 jam di atas *rotary shaker*. Selanjutnya diukur *optical density* (OD) dengan spektrofotometer ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ). Pengukuran OD dilakukan setiap setengah jam dari jam ke-0 sampai dengan jam ke-4, setelah jam ke-4 dilakukan pengukuran setiap 2 jam sekali. Viabilitas isolat divisualisasikan ke dalam kurva pertumbuhan.

## III. HASIL DAN DISKUSI

### A. Resistensi *Bacillus* Terhadap $\text{CdCl}_2$

Hasil uji resistensi yang diperoleh menunjukkan isolat *Bacillus* tumbuh sangat baik pada medium *nutrient agar* yang mengandung logam Cd konsentrasi 10, 20 dan 30 mg/L. Sedangkan pada konsentrasi 40 mg/L semua isolat *Bacillus* tumbuh kurang baik kecuali isolat *Bacillus* A6 dan S6. Pada



konsentrasi 50 mg/L hanya isolat *Bacillus* DA11 dan *B. cereus* yang tumbuh dan pertumbuhannya kurang baik, sedangkan isolat A6, S6, S1 dan SS19 tidak tumbuh sama sekali. Hasil uji resistensi dapat dilihat dalam Tabel 1.

Tabel 1. Resistensi *Bacillus* Terhadap  $\text{CdCl}_2$

Isolat <i>Bacillus</i>	Pertumbuhan isolat pada medium nutrient agar yang mengandung $\text{CdCl}_2$ (mg/L)				
	10	20	30	40	50
A6	+++	+++	+++	-	-
DA11	+++	+++	+++	++	+
S1	+++	+++	+++	++	-
S6	+++	+++	+++	-	-
SS19	+++	+++	+++	+	-
<i>B. cereus</i>	+++	+++	+++	++	+

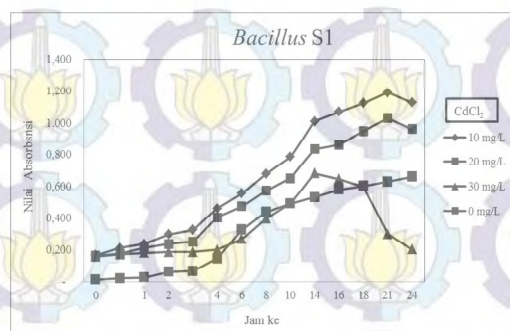
Keterangan: +++ (sangat baik), ++ (baik), + (kurang baik), - (tidak tumbuh)

Mekanisme resistensi bakteri terhadap logam berat kadmium (Cd) dapat dilakukan dengan bantuan protein metallothionein. Ion logam berat akan berikatan dengan kelompok gugus (-SH) pada protein metallothionein sehingga dapat menghambat aktivitas dan fungsi enzim yang mengandung gugus (-SH). Kation dipisahkan menjadi senyawa kompleks dengan tiol, sehingga toksisitas ion logam berat dapat dikurangi atau bahkan hilang [11]. Protein metallothionein yang berikatan dengan logam pada sel bakteri memiliki batas maksimum. Hal ini direspon bakteri dengan meningkatkan pembelahan sel untuk memperbanyak produksi Protein metallothionein. Menurut [12] bakteri Gram positif memiliki kemampuan lebih tinggi dalam mengikat logam dibandingkan bakteri Gram negatif disebabkan adanya gugus karboksil yang lebih banyak pada dinding sel bakteri Gram positif.

Berdasar uji resistensi. Isolat yang diuji viabilitasnya pada media *nutrien broth* yang mengandung logam Cd adalah isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11.

#### B. Viabilitas Isolat *Bacillus* yang Tercekam $\text{CdCl}_2$

Hasil kurva pertumbuhan *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 yang terpapar logam Cd dengan konsentrasi 10, 20 dan 30 mg/L menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama dengan pola pertumbuhan pada medium tanpa logam (Gambar 1).



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 tercekam logam Cd

Berdasarkan Gambar 1, fase lag ketiga isolat *Bacillus* yang terpapar logam sedikit lebih lambat dibanding pada medium tanpa logam (kontrol). Hal ini terjadi karena masing-masing isolat telah ditumbuhkan dalam medium *nutrient broth* tanpa logam, kemudian dipindah ke medium *nutrient broth* yang mengandung logam Cd. Penambahan logam Cd menyebabkan adanya adaptasi sehingga terjadi perlambatan fase lag. Adanya perbedaan lama fase lag dipengaruhi oleh konsentrasi logam Cd yang terdapat di dalam medium. Semakin tinggi konsentrasi logam Cd maka fase lag akan lebih panjang. [13] inokulasi kultur dari medium yang berbeda dapat memperpanjang fase lag.

Penambahan logam Cd ke dalam medium menyebabkan fase kematian lebih singkat dibandingkan dengan medium tanpa logam Cd. Fase kematian isolat *Bacillus* terjadi lebih cepat pada konsentrasi logam Cd 30 mg/L dibandingkan 20, 10 dan 0 mg/L. Paparan logam mengakibatkan bakteri merespon dengan meningkatkan jumlah pembelahan sel untuk produksi protein metallothionein yang mengandung gugus sulfhidril (-SH). Menurut [14] Cd merupakan logam berat yang memiliki efek toksisitas tinggi bagi organisme, bahkan pada tingkat konsentrasi yang rendah.

Logam berat dalam sel dapat berikatan dengan gugus sulfhidril (-SH) dari asam-asam amino sehingga menyebabkan terhambatnya kinerja enzim yang mempunyai gugus sulfhidril (-SH) dan mempunyai peranan penting dalam proses metabolisme sel. Selain itu, kerja ion-ion fisiologis dapat terganggu oleh adanya logam berat, seperti logam Cd yang mengganggu kerja ion Zn atau Ca. Hal ini disebabkan adanya kesamaan bilangan valensi antara logam Cd, Zn dan Ca. Senyawa oksianion logam berat apabila tereduksi dalam sel dapat menghasilkan radikal bebas yang akan berikatan dengan Deoxyribonucleic Acid (DNA) sehingga dapat mengakibatkan mutasi [11].



#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan diskusi diatas maka kesimpulan dari penelitian adalah

- (1). Semua isolat *Bacillus* resisten pada media *nutrient agar* yang mengandung logam  $\text{CdCl}_2$  sampai dengan 30 mg/L.
- (2). Isolat *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 mempunyai viabilitas pada media *nutrient broth* yang mengandung  $\text{CdCl}_2$  sampai dengan konsentrasi 30 mg/L.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis T.V mengucapkan terima kasih kepada Dr. Enny Zulaika, MP atas dukungan penelitian melalui pendanaan PNBP ITS tahun anggaran 2015 sesuai nomor kontrak 003246.IT2.11/PN.08/2015

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Widowati W, Sastiono A, Jusuf R. R. 2008. **Efek Toksik Logam Pencegahan dan Penanggulangan Pencemaran**. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- [2] Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C., & Ekwurugwu, J.N. 2007. Heavy Metal Pollution and Human Biotoxic Effects. Full Length Research Paper. **International Journal of Physical Sciences**, Vol 2 (5): 112-118
- [3] J. P. Chen, *Decontamination of Heavy Metals: Process, Mechanisms, and Applications*. Florida: Taylor & Francis Group (2012).
- [4] Chien, S.H., Carmona, G., Prochnow, L.L., & Austin, E.R. 2003. Cadmium Availability from Granulated and Bulk-Blended Phosphate-Potassium Fertilizers. **J. Environ. Qual.** 32: 1911-1914
- [5] Patrick, L. 2003. Toxic Metals and Antioxidants. Part II the Role of Antioxidant in Arsenic and Cadmium Toxicity – Toxic Metals part II. **Review**. *Alternativer Medicine Review*.
- [6] Alfian. 2005. Analisis Kadar Logam Kadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) dari Kerang yang Diperoleh dari Daerah Belawan secara Spektrofotometer Serapan Atom. **Jurnal Sains Kimia** Vol 9, No.2: 73-76
- [7] Jonak, C., Nakagami, H., & Hirt, H. 2004. Heavy Metal Stress. Activation Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. **Plant Physiology** 136: 3276-3283.
- [8] Hatmanti A. 2000. Pengenalan *Bacillus* SPP. *Balitbang Lingkungan Laut, Puslitbang Oseanologi-LIPI, Jakarta. Oseana*, Volume XXV, Nomor 1, 2000 : 31-41
- [9] L. Yun-guo, F. Bao-ying, F. Ting, Z. Hai-zhou, and L. Xin, "Tolerance and Removal of Chromium (VI) by *Bacillus* sp. Strain YB-1 Isolated from Electroplating Sludge," *Trans Nonferrous Met. Soc. China*, Vol 18 (2008) 480-487.
- [10] Zulaika E., Luqman A., Arinda T., & Sholikah U. 2012. Bakteri Resistensi Logam Berat yang Berpotensi Sebagai Biosorben dan Bioakumulator. **Seminar Nasional Waste Management for Sustainable Urban Development**. Teknik Lingkungan, FTSP-ITS, 21 Februari 2012
- [11] Nies, D.H. 1999. Microbial heavy metal resistance: molecular biology and utilisation for biotechnological processes. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 51: 730-750.
- [12] Colak, F., Atarb, N., Yazicioglu, D. & Olgun, A. 2011. Biosorption of lead from aqueous solution by *Bacillus* strains processing heavy-metal resistance. **Chemical Engineering Journal**, 173: 422 – 428
- [13] Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. 2002.. **Microbiology**, 5<sup>th</sup> Edition. New York: McGraw-Hill.
- [14] Almeida, J. A., Barreto, R.E., Novelli, L. B., Castro, F. J., and Moron, S. E. 2009. Oxidative Stress Biomarkers and Agressive Behavior in Fish Exposed to Aquatic Cadmium Contamination. **Neotropical Ichthyology** 7: 103-108



TUGAS AKHIR - SB141510



# RESISTENSI DAN POTENSI *Bacillus* SEBAGAI *BIOREMOVAL* LOGAM KADMIUM (Cd)

---

TRIO VERDIAN

1511 100 073

N. Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si.

Penguji I

Dr. Nurul Jadid. M.Sc

Penguji II

Dr. Enny Zulaika, MP

Penguji III

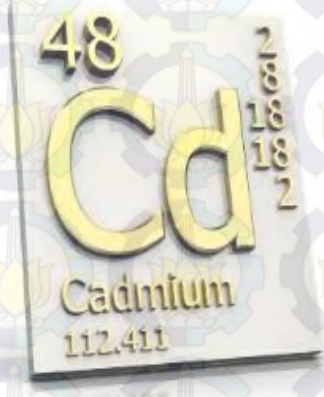


# PENDAHULUAN





# LATAR BELAKANG



Kadmium (Cd) merupakan :

- Logam berat
- Massa jenis 8,65 g/cm<sup>3</sup>
- Persisten di lingkungan
- Memiliki efek toksik yang tinggi, walaupun pada konsentrasi yang rendah



Efek Toksik Kadmium:

- Sifat reaktif, menginaktifkan enzim yang terdapat dalam sel,
- Menghambat pembentukan asam nukleat,
- Menghambat sintesis protein



Beberapa bakteri mampu resisten terhadap logam berat Cd diantaranya:

- *Bacillus cereus*
- *Vibrio harveyi*
- *Staphylococcus aureus*



*Bacillus* hasil isolasi  
Kalimas Surabaya  
resisten terhadap  
logam kadmium  
hingga konsentrasi 45  
ppm.



isolat *Bacillus* hasil isolasi Kalimas  
belum diketahui kemampuannya sebagai *bioremoval*  
terhadap logam berat Cd.



# RUMUSAN MASALAH

Anggota genus *Bacillus* yang diisolasi dari Kalimas Surabaya resisten terhadap logam Cd, apakah anggota genus *Bacillus* tersebut mampu melakukan *bioremoval* terhadap logam Cd?



# BATASAN MASALAH

Isolat yang digunakan adalah *Bacillus* A<sub>6</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>1</sub>, SS<sub>19</sub>, DA<sub>11</sub> dan ATCC 1178 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA-ITS.

Logam Cd yang digunakan adalah CdCl<sub>2</sub>.

Pengukuran konsentrasi CdCl<sub>2</sub> dengan metode spektrofotometri menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS) dengan panjang gelombang  $\lambda = 228,8 \text{ nm}$ .



# TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk;

1. Mendapatkan anggota genus *Bacillus* yang resisten Cd
2. Mengetahui kemampuan isolat melakukan *bioremoval* terhadap logam Cd.



# MANFAAT

Penelitian ini diharapkan bahwa isolat *Bacillus* diatas dapat dimanfaatkan sebagai agen *bioremoval* logam Cd dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen bioremediasi lahan tercemar Cd yang ramah lingkungan.



# METODOLOGI



ITS  
Institut  
Teknologi  
Sepuluh Nopember



# WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Waktu penelitian bulan Desember  
2014 sampai Mei 2015

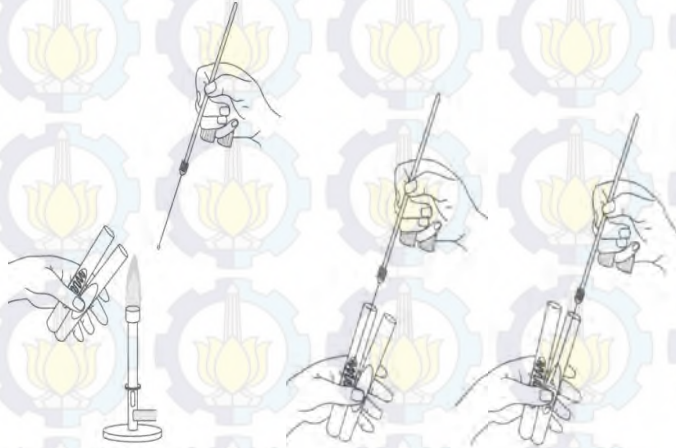
Tempat penelitian di Laboratorium  
Mikrobiologi dan Bioteknologi  
Jurusan Biologi FMIPA-ITS, Surabaya



# SUBKULTUR ISOLAT & REKONFIRMASI



isolat A<sub>6</sub>,  
S<sub>1</sub>, S<sub>6</sub>, SS<sub>19</sub>  
dan DA<sub>11</sub>



Satu ose isolat  
diambil secara  
aseptis



Diinokulasikan  
dengan metode  
*streak*  
*continuous*



Diinkubasi 24  
jam pada  
suhu ruang



Keberhasilan subkultur  
ditandai adanya koloni  
yang tumbuh pada media  
*agar slant*



# SUBKULTUR ISOLAT & REKONFIRMASI

## REKONFIRMASI



Subkultur  
*Bacillus*

Pengamatan Sel

Pengamatan Gram

Uji Motilitas

Uji Endospora

Aerob/Fakultatif Anaerob

Kemoorganotrof

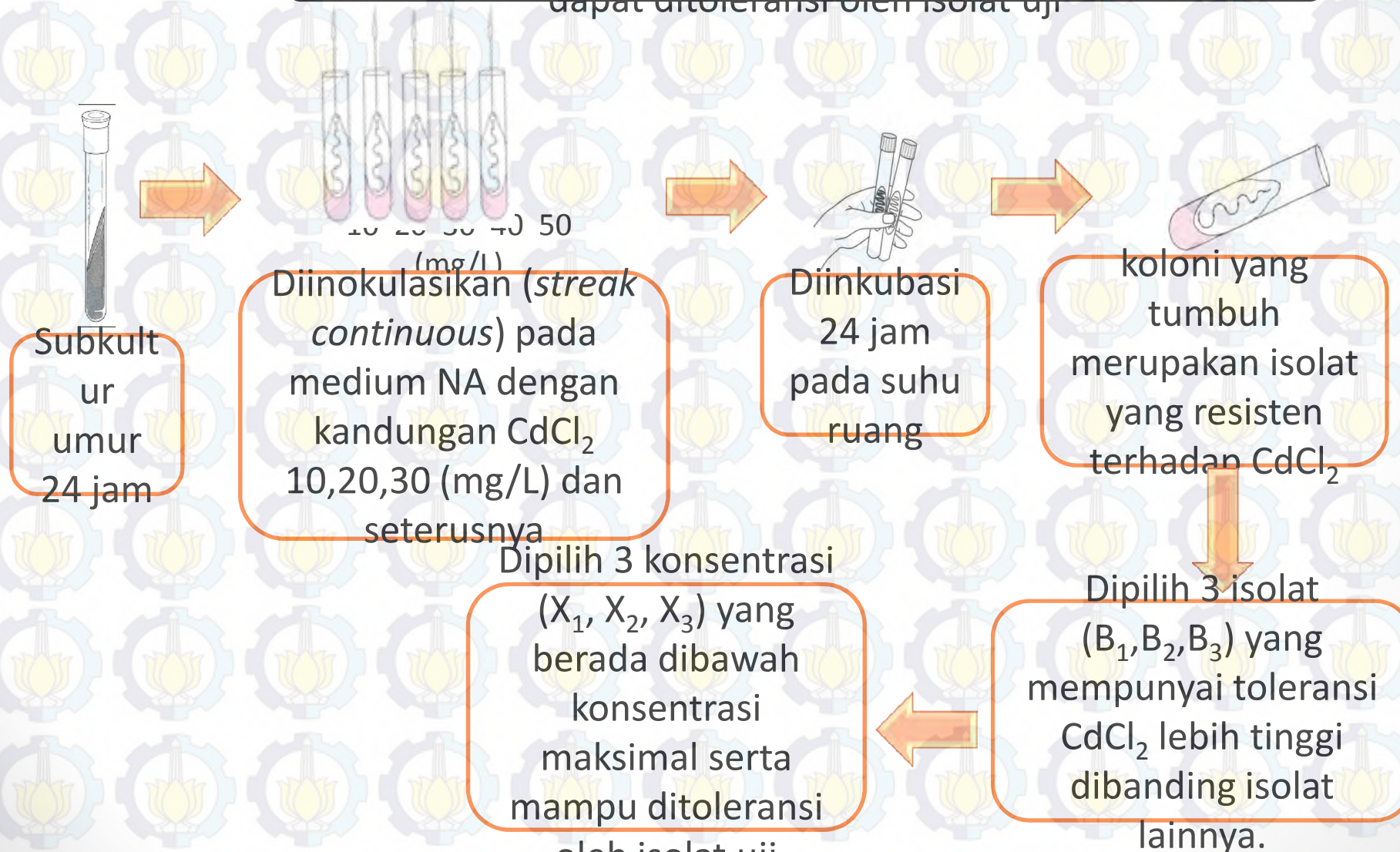
Katalase



# Uji Resistensi Isolat *Bacillus* dan Range Finding

## Test $\text{CdCl}_2$

Untuk mengetahui daya tahan isolat terhadap cekaman  $\text{CdCl}_2$  serta menentukan konsentrasi logam  $\text{CdCl}_2$  yang dapat ditoleransi oleh isolat uji







Untuk mengetahui daya hidup isolat terhadap cekaman logam Cd



Satu ose isolat terpilih diinokulasikan ke 20 ml NB



Inkubasi diatas rotary shaker 24 jam suhu ruang



Kultur Ditambah medium NB 180 ml



Ditambah  $\text{CdCl}_2$  sesuai range finding test ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ )



Inkubasi diatas rotary shaker suhu ruang

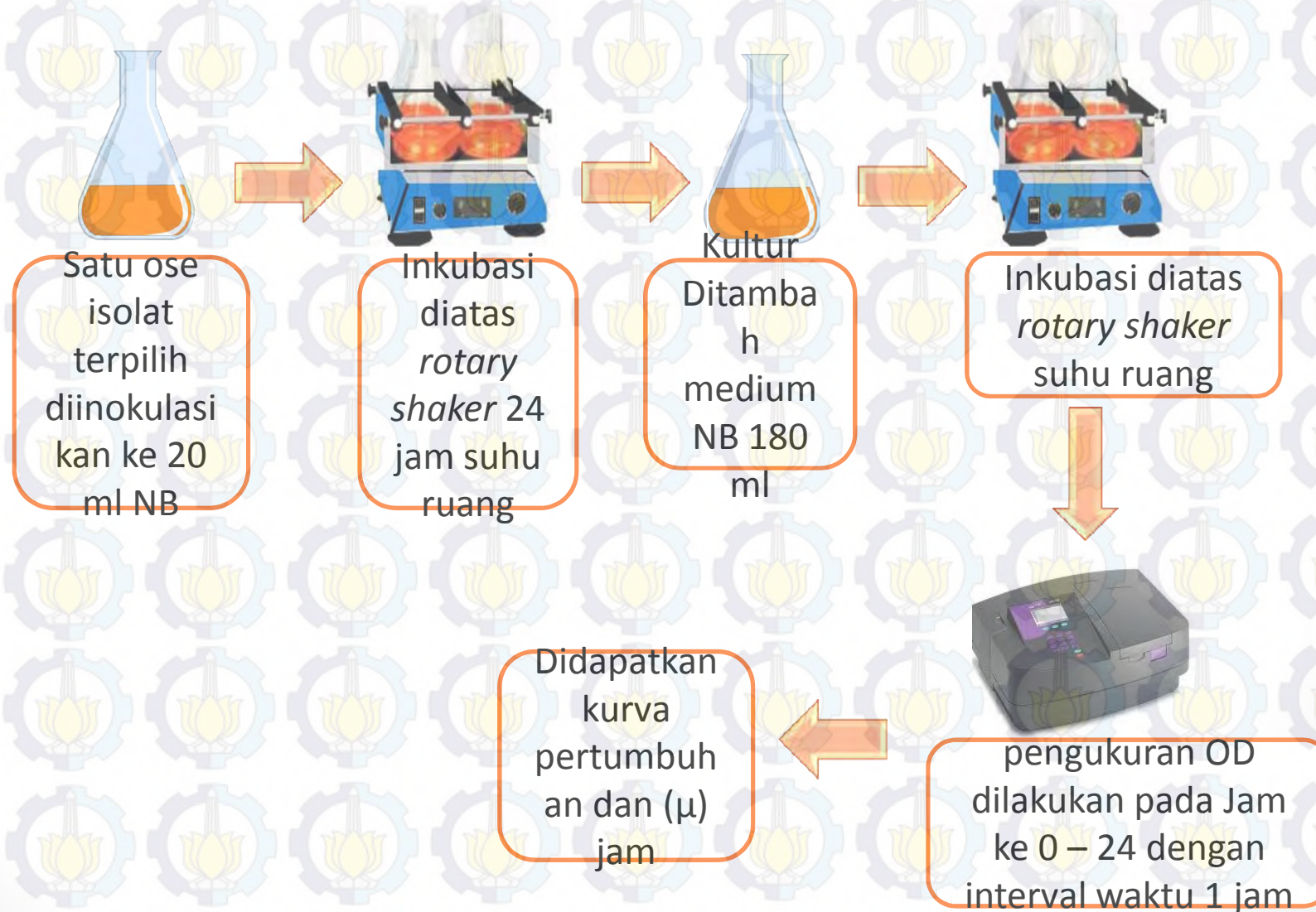


Jam ke 0 – 24 dilakukan pengukuran OD dengan interval waktu 1 jam

Didapatkan kurva pertumbuhan

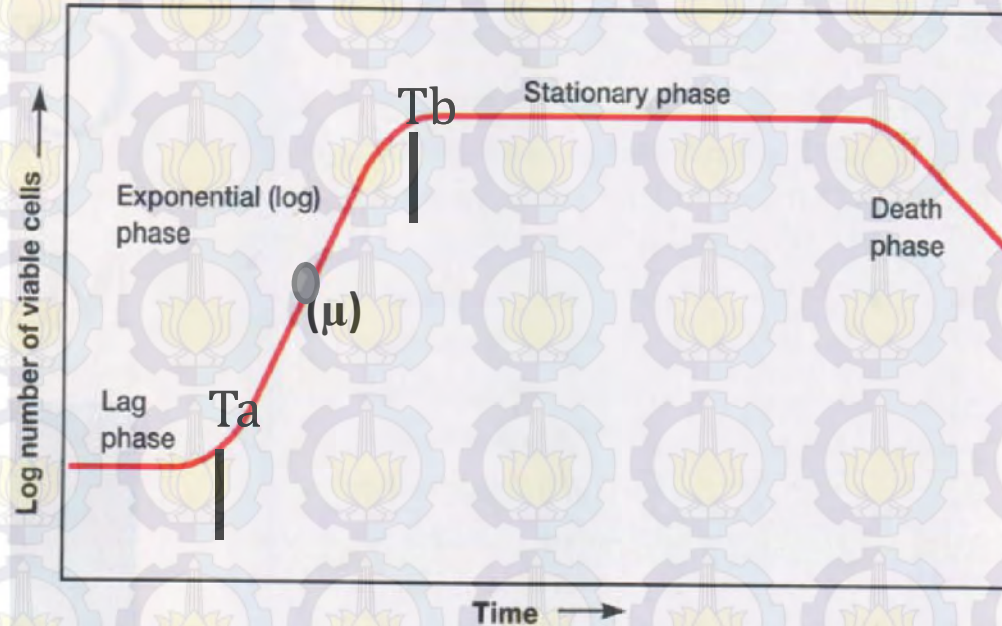


# Penentuan Umur Perilaku ( $\mu$ Jam) pada Isolat *Bacillus* sebagai Starter Uji *Bioremoval*





# KURVA PERTUMBUHAN *Bacillus*



Keterangan:

Sumbu x = waktu (jam)

Sumbu y = Kepadatan sel

$$(\mu) \text{ jam} = \frac{T_b - T_a}{2} + T_a$$

$T_a$ : waktu awal fase log

$T_b$ : Waktu akhir fase log

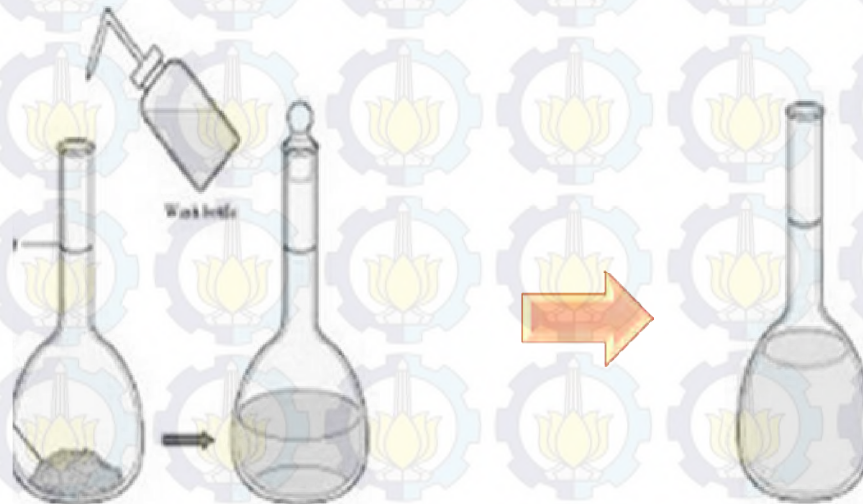
Berdasarkan kurva pertumbuhan isolat *Bacillus* akan didapatkan  $(\mu)$  jam pada umur perlakuan untuk uji *bioremoval* pada  $\text{CdCl}_2$



# UJI *BIOREMOVAL* LOGAM BERAT



Pembuatan Larutan *Stock*  $\text{CdCl}_2$  100 mg/L



10 mg  $\text{CdCl}_2$

Dilarutkan  
dalam 100 ml  
aquades steril  
secara aseptis

Didapatkan  
larutan *stock*  
 $\text{CdCl}_2$  konsentrasi  
100mg/L



# UJI BIOREMOVAL LOGAM BERAT



## Pembuatan Starter *Bacillus*

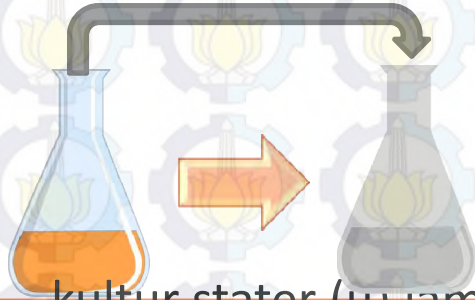




# UJI BIOREMOVAL LOGAM BERAT



Uji *Bioremoval*



kultur stater ( $\mu$ ) jam  
ditambahkan hingga 25 ml  
Ke dalam wadah yang telah  
berisi  $\text{CdCl}_2$  sesuai *range*  
*finding test*



Inkubasi 100 rpm  
diatas *rotary*  
*shaker* suhu  
ruang selama 24  
jam

KONTROL



$\text{CdCl}_2$  sesuai *range*  
*finding test* tanpa  
inokulum



0,5 ml untuk  
Viabilitas



25ml Kultur  
dengan  $\text{CdCl}_2$

24,5 ml Kultur  
dengan  $\text{CdCl}_2$

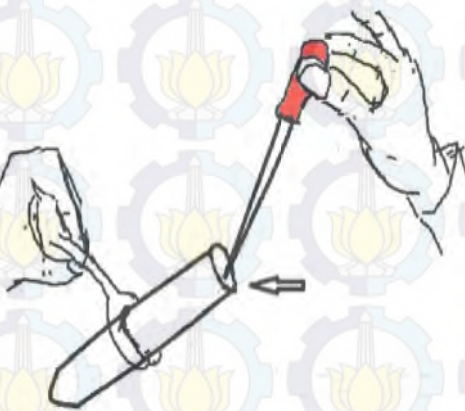


4.000 rpm (20  
menit)

Dipisahkan supernatan  
Dan pellet



Supernatant



Diitambah 2  
tetes  $\text{HNO}_3$  dan  
dipanaskan



Dianalisis  
dengan AAS  
( $\lambda=228,8$ )



# PENGUKURAN *BIOREMOVAL*

$$R = K_0 - K_s$$

$$E = (R/K_0) \times 100\%$$

R = Konsentrasi Cd yang di *removal* oleh *Bacillus*

K<sub>0</sub> = Konsentrasi awal Cd dalam medium tanpa inokulum *Bacillus*

K<sub>s</sub> = Konsentrasi akhir Cd pada medium yang telah dipisahkan dari pellet *Bacillus* (filtrat)

E = Efisiensi *removal* isolat yang telah dipisahkan.



# UJI VIABILITAS



100  $\mu$ l isolat  
yang terpapar  
 $\text{CdCl}_2$   
diinokulasikan  
secara aseptis



Medium NA



Medium NA  
dituang (*pour plate*)



Diinkubasi 24  
jam pada suhu  
ruang



Koloni yang  
tumbuh  
menunjukkan  
viabilitas *Bacillus*  
terhadap  $\text{CdCl}_2$



Viabilitas  
dihitung  
dengan  
metode CFU  
(*Colony  
Forming Unit*)



# RANCANGAN PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Uji Resistensi Cd → Metode Kualitatif  
Uji *Bioremoval* Cd → Metode Kuantitatif

- Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL)
- Perbedaan perlakuan dianalisis dengan *Analysis of Varians* (ANOVA) pada taraf kepercayaan 95%
- Apabila terdapat perbedaan maka dilakukan uji beda nyata dengan uji beda nyata terkecil (BNT)



# HASIL DAN PEMBAHASAN





# Rekonfirmasi Isolat *Bacillus*

Bergey's Manual  
Determinative Bacteriology  
(Holt *et al.*, 1994)

Basil

Gram-positif

Mampu menghasilkan  
endospora

Katalase positif

Aerob/anaerob fakultatif

Motil

Kemoorganotrof



# Resistensi Isolat *Bacillus* dan *Range Finding Test* terhadap $\text{CdCl}_2$

Isolat <i>Bacillus</i>	Pertumbuhan isolat <i>Bacillus</i> pada medium yang mengandung $\text{CdCl}_2$ (mg/L)			
	0.1	30	40	50
A6	+++	+++	-	-
DA11	+++	+++	++	+
S1	+++	+++	++	-
S6	+++	+++	-	-
SS19	+++	+++	+	-
<i>B. cereus</i>	+++	+++	++	+

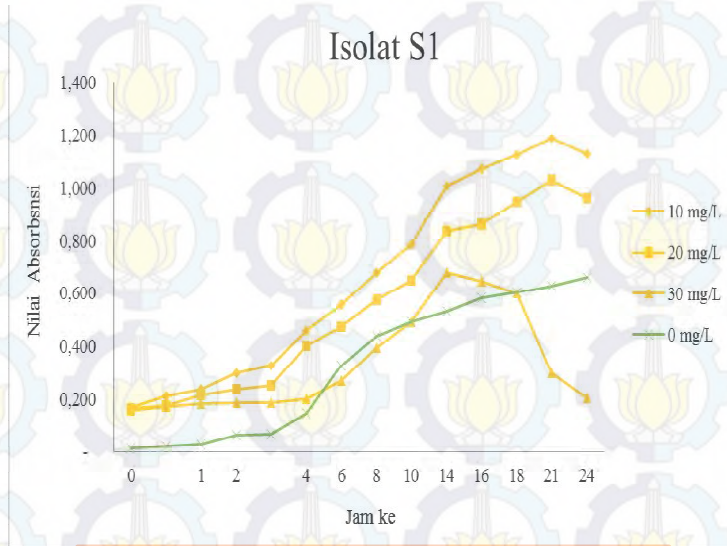
Keterangan: +++ (baik), ++ (cukup baik), + (kurang baik), - (tidak tumbuh)

semua isolat *Bacillus* resisten terhadap logam Cd hingga konsentrasi optimal 30 mg/L. Isolat yang digunakan adalah S1,SS19 dan DA11.

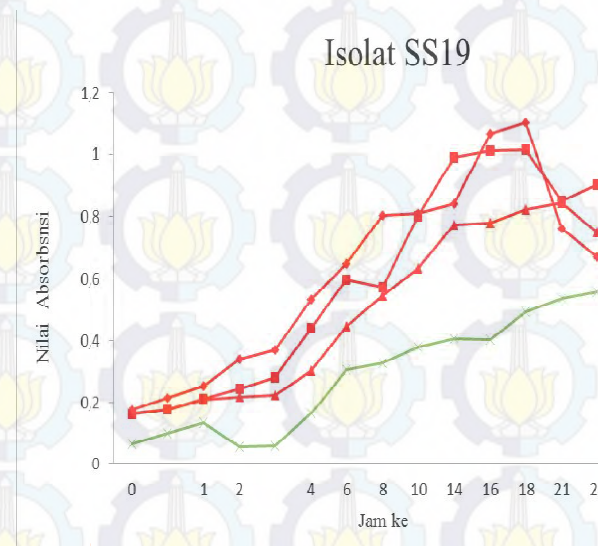
Konsentrasi yang digunakan adalah 10,20 dan 30 mg/L.



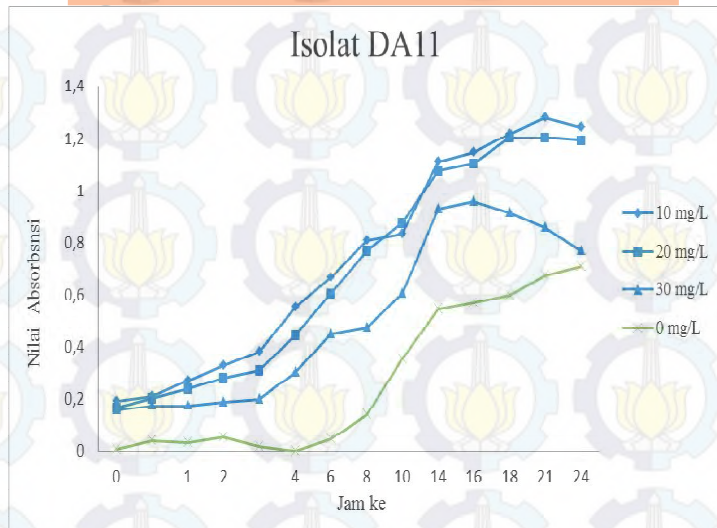
# Viabilitas Isolat terhadap Cekaman $\text{CdCl}_2$



Kurva Pertumbuhan *Bacillus*



Kurva Pertumbuhan *Bacillus* SS19

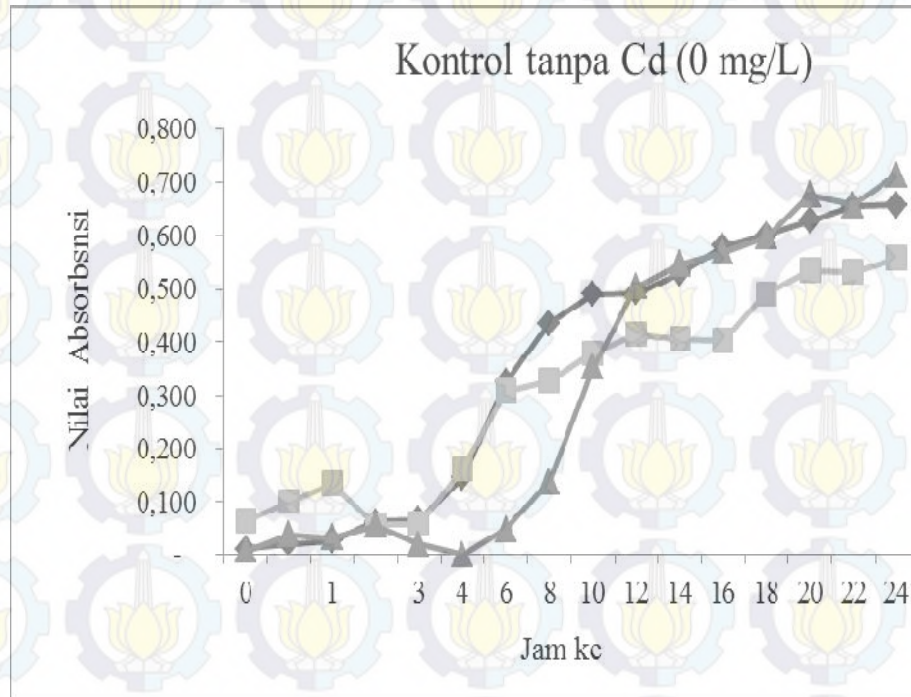


Kurva Pertumbuhan *Bacillus* DA11

Pertumbuhan isolat *Bacillus* terpapar logam lebih lambat dan mengalami fase kematian lebih cepat



# Starter *Bacillus* ( $\mu$ jam)



Berdasarkan kurva pertumbuhan yang didapat, umur perlakuan ( $\mu$  jam) ketiga isolat adalah jam ke-12

Kurva Pertumbuhan *Bacillus* S1, SS19 dan DA11 Tanpa Logam

$$\mu \text{ jam} = \frac{\text{fase eksponensial akhir} - \text{fase eksponensial awal}}{2} + \text{fase eksponensial awal} = \frac{18-6}{2} + 6 = 6 + 6 = 12$$



# Konsentrasi Logam Cd tanpa inokulum

Konsentrasi Perlakuan Cd (mg/L)	Konsentrasi Cd terukur AAS (mg/L)*
10	6,527
20	15,092
30	23,75

\*Sumber: Laboratorium Balai Riset dan Standarisasi Industri  
Surabaya

Berdasarkan pengukuran tersebut konsentrasi perlakuan  
untuk *bioremoval* adalah 6,527; 15,092 dan 23,75  
mg/L.



# Bioremoval Logam Cd

Isolat	Konsentrasi Cd terukur AAS (mg/L)*	Konsentrasi sisa (mg/L)	Konsentrasi bioremoval (mg/L)	Efisiensi bioremoval (%)	Baku mutu Cd di lingkungan (mg/L)**
DA11	6,527	4,19	2,337	35,81	0,1
	15,092	11,78	3,312	21,95	
	23,75	20,02	3,73	15,71	
S1	6,527	7,835	-1,308	-20,04	
	15,092	20,348	-5,256	-34,83	
	23,75	23,94	-0,19	-0,80	
SS19	6,527	4,842	1,685	25,82	
	15,092	12,74	2,352	15,58	
	23,75	24,132	-0,382	-1,61	

\*Sumber: Laboratorium Balai Riset dan Standarisasi Industri Surabaya

\*\* Sumber: Peraturan Menteri Negara Lingkungan Hidup No.3 Tahun 2010

Isolat DA11 dan SS19 menunjukkan aktifitas *bioremoval* Cd semakin besar seiring besarnya konsentrasi, tetapi efisiensi *bioremoval*-nya semakin kecil. Isolat S1 menunjukkan hasil *bioremoval* negatif.



# Bioremoval Logam Cd

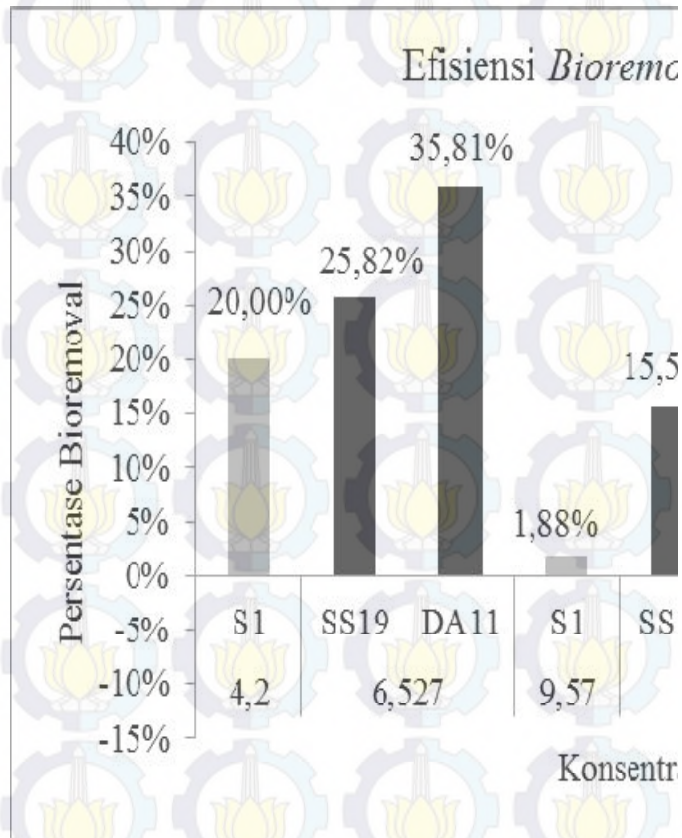
Isolat	Konsentrasi Perlakuan Cd (mg/L)	Konsentrasi Cd terukur AAS (mg/L)*	Konsentrasi sisa (mg/L)	Konsentrasi bioremoval (mg/L)	Efisiensi bioremoval (%)
S1	10	4,2	3,36	0,84	20,00
	20	9,57	9,39	0,18	1,88
	30	15,22	16,54	-1,32	-8,67

\*Sumber: Laboratorium Balai Riset dan Standarisasi Industri Surabaya

Isolat S1  
menunjukkan  
aktifitas  
*bioremoval* Cd  
semakin besar  
seiring besarnya  
konsentrasi, tetapi  
efisiensi  
*bioremoval*-nya  
semakin kecil.



# Efisiensi *Bioremoval* Logam Cd



Isolat DA 11 memiliki nilai efisiensi *bioremoval* paling tinggi dibanding kedua isolat lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa isolat DA11 memiliki potensi yang lebih besar dalam me-*removal* logam Cd.



# Viabilitas *Bacillus* setelah terpapar Cd

Isolat	Konsentrasi Cd (mg/L) yang telah dipaparkan		
	10	20	30
S1	>300 CFU	>300 CFU	166 CFU
SS19	>300 CFU	155 CFU	59 CFU
DA11	>300 CFU	>300 CFU	179 CFU

Pertumbuhan koloni **semakin menurun** seiring dengan **besarnya konsentrasi**



# KESIMPULAN



ITS  
Institut  
Teknologi  
Sepuluh Nopember



Berdasarkan hasil dan pembahasan maka kesimpulan dari penelitian adalah

- Semua isolat *Bacillus* resisten terhadap logam Cd sampai dengan 15,22 mg/L.
- Isolat *Bacillus* DA11 dapat mengurangi konsentrasi Cd di medium paling besar dibanding isolat S1 dan SS19 yaitu 2,337 mg/L sampai dengan 3,73 mg/L dari konsentrasi yang dipaparkan. Efisiensi *bioremoval* isolat *Bacillus* DA11 antara 15% - 35,81% dari konsentrasi yang dipaparkan.



**TERIMA KASIH**



**ITS**  
Institut  
Teknologi  
Sepuluh Nopember